

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 表 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-506930

(43)公表日 平成11年(1999)6月22日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 35/30		A 6 1 K 35/30	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 56 頁)			
(21)出願番号	特願平9-501153	(71)出願人	アメリカ合衆国 アメリカ合衆国メリーランド州20852, ロ ックヴィル, エグゼキューティブ・プール ヴァード 6011, ボックス 13, ナシヨナ ル・インスティテュート・オブ・ヘルス, オーティーティー
(86) (22)出願日	平成8年(1996)6月6日	(72)発明者	メイジャー, ユージーン・オー アメリカ合衆国ヴァージニア州22124, オ ークトン, エルムスミード・コート 2919
(85)翻訳文提出日	平成9年(1997)12月8日	(74)代理人	弁理士 社本 一夫 (外5名)
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 6 / 0 8 6 1 7		
(87)国際公開番号	W O 9 6 / 3 9 4 9 6		
(87)国際公開日	平成8年(1996)12月12日		
(31)優先権主張番号	0 8 / 4 6 7 , 9 5 8		
(32)優先日	1995年6月6日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 移植治療のための神経由来胎児細胞系列

(57)【要約】

本発明は概ね、宿主と遺伝学的に関係のない細胞による、宿主の治療のための方法に関する。さらに特に、本発明は、ヒト胎児神経由来の細胞系列、およびこれらの不死ヒト胎児神経由来細胞の宿主への移植による、宿主の治療の方法を提供する。

【特許請求の範囲】

1. 異種の核酸配列を含み、該異種の核酸配列を発現することができる、不死ヒト胎児神経由来細胞系列。
2. 細胞系列がグリア細胞系列である、請求項1の細胞系列。
3. 細胞系列がヒト胎児星状膠細胞に由来する、請求項1の細胞系列。
4. 異種の核酸配列が生物学的に活性のあるペプチドをコードする、請求項1の細胞系列。
5. 生物学的活性のあるペプチドが酵素である、請求項3の細胞系列。
6. 生物学的活性のあるペプチドが病気に関連した抗原である、請求項3の細胞系列。
7. 生物学的活性のあるペプチドがチロシンヒドロキシラーゼである請求項3の細胞系列。
8. 核酸配列が機能可能に転写プロモーターと連結している、請求項1の細胞系列。
9. SVG-TH細胞系列である請求項7の細胞系列。
10. phTH/Neoプラスミドを発現することができる請求項7の細胞系列。
11. さらにセロトニンを発現することができる請求項1の細胞系列。
12. 請求項1の細胞系列に由来する細胞、および薬学的に受容できる担体を含む移植可能な組成物。
13. 細胞が抗体不透過性の膜に包まれている、請求項12の移植可能な組成物。
14. 膜がアルギン酸ゲル膜である請求項13の移植可能な組成物。
15. 神経学的な病気または疾患を治療するために有効な量の請求項1の細胞系列を薬学的に受容できる担体と共に投与することからなる、そのような治療を必要とする患者における前記疾患の治療方法。
16. 神経学的な病気または疾患がパーキンソン病である請求項15の方法。

【発明の詳細な説明】**移植治療のための神経由来胎児細胞系列****発明の背景**

本発明は、宿主に遺伝学的に他種の細胞を移植することによる、宿主の治療法に概ね関する。特に、本発明は複数の不死化ヒト胎児神経由来細胞系列、およびそれらの細胞系列を宿主または患者に移植することによる宿主の治療法に関する。

臓器移植は、種々の疾病について、有効であり広範に実施されている治療法である。心臓、腎臓、さらには肝臓移植が、多くの医療機関においてほぼ日常的である。しかし、多くの臓器の異常については、臓器の全体移植による治療は不可能である。例えば、中枢神経系の損傷は、損傷組織を置換するための全体移植によって治療され得ない。

全体移植治療による損傷組織の置換は多くの疾病において、さらには特定の疾病を有する患者の全てには可能ではないため、細胞移植の方法を開発するために種々の試みがなされてきた (Sun et al., *Biomat., Art. Cells, Art. Org.*, 15:483-496(1987))。生物活性化合物の不全を引き起こす実質細胞の損傷は、その生物活性化合物を分泌する、単離された細胞または細胞塊の移植によって治療され得る。例えば、糖尿病の動物は、ドナーの膵臓から分離したランゲルハンス島の移植によって首尾よく治療されてきた (Noel et al., *Metabolism*, 31:184(1982))。

細胞移植治療は、神経学的な疾病の治療に特に有効である。固組織移植は神経の疾患にはいくつかの理由で特に不適當である。固組織移植に必要な、外科手術による脳の露出によって、臨床における神経の欠損を引き起こす神経系統への修復不能な損傷が生じ得る。また、神経機能はしばしば複雑な細胞間結合に依存しており、この結合は外科的に構築することができない。さらに、中枢神経系細胞は酸素の欠乏および栄養の欠乏に極めて敏感である。移植固組織の内部細胞は生

存を維持するためのかん流がしばしば欠乏するため、固組織に迅速に導管が形成されることが重要である (Stenevi et al., *Brain Res.*, 114:1-20(1976))。

一般的な神経疾患の1つであるパーキンソン病は、細胞移植治療の努力の対象であった (Bjorklund et al., Brain Res., 177:555-560(1979); Lindvall et al., Science, 247:574-577(1990); Freed, Restor. Neurol. Neurosci., 3:109-134(1991))。パーキンソン症候群は、基底神経節の黒質中のドーパミン産生ニューロンの欠失によって引き起こされる (Burns et al., N. Engl. J. Med., 312:1418-1421(1985); Wolff et al., Neurobiology, 86:9011-9014(1989))。パーキンソン病はパーキンソン症候群の臨床的症状により規定される原因不明の疾病であるが、これらはドーパミン産生神経の突発的損傷により起こる。パーキンソン症候群は様々な薬剤、例えば抗精神病薬、または化学薬、例えば1-メチル4-フェニル1,2,3,6-テトラヒドロピリジンにより引き起こされる可能性がある (Burns et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4546-4550(1983) and Bankiewicz et al., Life Sci., 39:7-16(1986))。

実験的に誘導されたパーキンソン症候群の臨床的症状を覆すという試みが病に冒された動物の線状体へのドーパミン作動性細胞の移植により行われた。遺伝的に修飾された繊維芽細胞 (チロシン水酸化酵素をコードするDNAを導入したもの) はドーパミン作動性経路に障害を有する動物へ首尾よく移植された。動物の運動機能及び行動はドーパミン産生繊維芽細胞の移植の後、改善された (Wolff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9011-9014(1989); Fisher et al., Neuron, 6:371-380(1991))。誕生後に得られた細胞と比較すると胎児組織の移植により、移植組織の残存は向上し、それゆえ臨床的回復は延長した (Gage and Fisher, Neuron, 6:1-12(1991))。新鮮な胎児ドーパミン作動性神経を、黒色線状体ドーパミン系を化学的に損傷させた猿の尾形神経核へ移植した。移植の後、障害により誘導された行動欠損は改善された (Bankiewicz et al., J. Neurosurg., 72:231-244(1990) and Taylor et al., Prog. Brain Res., 82:543-559(1990))。

パーキンソン症候群により苦痛を受ける人はドーパミン作動性神経の線状体移植により治療されていた (Lindvall et al., Arch. Neurol., 46:615-631(1989); Widner et al., New Engl. J. Med., 327:1556-1563(1992))。移植細胞は堕胎児より

得ていた。中絶に先立ち、女性はいくつかのウイルス性疾患の抗体により選別さ

れた。外科手術の後、治療を受けた患者は神経機能の改善を見せた。しかし、患者は免疫抑制療法の継続を必要とした。

近年の研究は中枢神経系の支持細胞より放出される栄養因子が細胞培養における神経の生存に決定的であると示唆する (O'Malley et al., *Exp. Neurol.*, 112:40-48(1991))。神経成長因子を発現するよう遺伝的に作りかえられた繊維芽細胞の移植は、アルツハイマー病に観察されるような基底前脳におけるアセチルコリン作動性神経の死を引き起こす、脳弓系損傷の後の、基底前脳のコリン作動性神経の生存の増強を示した (Rosenberg et al., *Science*, 242:1575-1577(1988))。

神経障害の細胞移植療法における先の試みは促進的結果を提供したが、一方、いくつかの重要な問題が残る。細胞移植のための胎児組織の供給は非常に制限されている。最大の生存性を保障するため胎児細胞は移植に先立ち新たに得なければならない。これは移植手続と中絶の時期を調整することを必要とする。しかし、胎児組織は米国においては広範には得られない。また、細胞を得る胎児の胎齢も移植組織の生存に影響する (Gage and Fisher, *supra.*)。特定の胎齢の胎児組織を得る必要性が移植のための胎児細胞の入手にさらに制限を加える。さらに、倫理的考慮により潜在的移植受容者によっては新鮮な胎児細胞が移植されるとき治療手続を嫌悪する。

新鮮な堕胎児より胎児組織を得るため、伝染病汚染の重大な危険が存在する。胎児組織を供給する中絶を行う女性は様々な伝染病の検査を受けるが、いくつかの伝染病、例えばHIVは臨床的に検出できない可能性があり、それにより選別の過程の間に検出できない可能性がある。そのため、もし広範に実施すれば、新鮮な胎児細胞の移植は多くの伝染病の余病を引き起こすだろう。

不死化細胞系列はこれら多くの入手及び伝染病の問題を克服するだろう。不死化ヒト胎児神経由来細胞系列はMajor et alにより報告されている (Major et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1257-1262(1985) and 米国特許第4707448号)。さらに言えば、不死化細胞系列はin vivo移植の後腫瘍を形成しやすい性質がある。そのため、不死化細胞を脳内に移植する治療は頭蓋内に腫瘍を形成する高い

危険があり、及び腫瘍が良性組織を有するとしても頭蓋冠の内側にあるときは疾病の予後判断は困難であろう。

腫瘍形成の危険に加え、遺伝的に関連のない細胞の移植は移植細胞の免疫的拒絶及び脳炎の危険も有する (Widner and Brudin, Brain Res. Rev., 13:287-324(1988))。遺伝的に関連のない細胞の移植は全てこの危険を伴う。そのため、脳内細胞移植治療を受けた患者は長期の免疫抑制治療を必要とした。免疫抑制は、不死化細胞を移植していなくとも、伝染病及び悪性合併症の高い危険を有する。不死化細胞の移植はそのような合併症の危険を拡大する。

当該技術分野において緊急に必要とされるものは治療力を有する不死化ヒト胎児神経由来細胞の移植法、及びこの利用に適した細胞系列である。理想的にはその方法は移植後の腫瘍の形成または激症を引き起こさない。望ましくは、その方法は伝染病汚染の危険及び細胞入手の制限を最小限にするための細胞系列から細胞を得ることを要するだろう。非常に驚いたことに、本発明はこれら及び他の関連要求を充たす。

発明の概要

本発明は宿主に移植した不死化ヒト胎児神経由来細胞系列移植細胞を含む、宿主の治療方法を提供する。概ね細胞系列はSVG細胞系列といった、ヒト胎児星状膠細胞に由来する。この細胞はしばしば宿主の中樞神経系に移植される。この細胞は宿主の抗体を透過しない膜に包んでよい。

本発明の態様において、細胞にペプチドをコードする核酸を導入してよい。このペプチドは、概ねチロシン水酸化酵素などの酵素、または神経成長因子などの成長因子である。このペプチドは疾病関連抗原でもよい。この細胞は治療または予防の目的で移植してよい。いくつかの例において、この細胞は移植の後除去される可能性がある。

追加的態様において、本発明は異型核酸配列を含む不死化ヒト胎児神経由来細胞系列を提供する、その点でこの細胞系列は異型核酸配列を発現し得る。チロシン水酸化酵素をコードする核酸を発現し得る細胞系列が特に好まれる。さらに好まれる面として、本発明の細胞系列はセロトニンを発現し得る。

関連の態様において、本発明は薬学的に受容できる保有者関連の発明の細胞系列を含む組成物を提供する。

図面の簡単な説明

図1はSVG細胞系列のin vitroでの形態を示す。

図2はSVG細胞における抗SV40 T蛋白質抗体の免疫過酸化酵素染色（イムノペルオキシダーゼステイニク）を示す。

図3は基底神経節における針の跡を低倍率で示す。

図4は基底神経節における針の跡を高倍率で示す。

図5は基底神経節における針の跡を異なる高倍率で示す。

図6は脳側室壁におけるSVG細胞の巣を示す。

図7は脳側室壁における移植されたSVG細胞の抗神経膠繊維性酸性蛋白質抗体での染色を示す。

図8はin vivoにおける移植されたSVG細胞の切断面の抗T蛋白質抗体での染色を示す。

図9は移植後6ヶ月の猿の脳のガドリニウム増強T₁荷重MRIを示す。

図10はin vivoにおける移植されたSVG細胞層におけるチロシン水酸化酵素ニューロンの成長を示す。

図11はSVG-TH細胞系列の構築に使用されたphTH/Neoプラスミドの構造の大まかな図を示す。

図12は安定したphTH/Neo導入体のチロシン水酸化酵素免疫組織化学的染色を示す。

図13は図12での免疫組織化学を確認する、一つのTH陽性クローン(1B1B)のウェスタンブロッティングを示す。

図14はSVG-TH細胞培養液上清のHPLC解析のクロマトグラムを示す。リテンションタイム25.65及び、37.1分のピークは、セトロニン及び、セロトニン分解産物である5-ヒドロキシインドール酢酸のリテンションタイムと各々一致する。これはセロトニンに関するSVG-TH細胞の免疫組織化学的染色により確認された。

図15はSVG-TH細胞の電子顕微鏡写真を示す。

図16AはhNT/SVG-TH共培養約72時間後の細胞の免疫組織化学的染色を示す。個々の小さく平板な細胞がSVG-TH細胞である。図16BはPC12/SVG-TH共培養約92時間後の免疫組織化学的染色を示す。PC12細胞は写真中央付近でSVG-TH細胞付近の神経突起を伸展しているのが観察できる。SVG細胞でも同様の結果が得られた。

図17はトランスウェル・チャンバー (transwell chamber) ごとにドーパミン作動性細胞を100000細胞撒き、SVGとの共培養および共培養でない状態でのTH陽性細胞数の分布のグラフを示す。SVG細胞の存在及び不在において96時間培養時の、transwell chamberごとに残存するTH陽性ラット中脳細胞数を示す (Y軸)。SVG-TH細胞との培養は同一の結果を出した。

図18はラットパーキンソン症候群モデルへのSVG-TH移植の効果を示す。機能障害はモデルラットにおける1時間当たりの回転数により示す。ラットの障害線状体へSVG-TH細胞を移植する前及び4週間後にアポモルフィンを投与した後のラットの1時間当たりの回転数を示す (黒四角、黒菱形、白四角、白菱形、及び白点つき黒四角により示す)。2回のSVG移植の結果も示す (黒三角及び黒点つき白四角により示す)。

図19、20及び21はMPTPによりパーキンソン病の症状を誘導された3匹のアカゲザル (H002、H005及びT022) の尾形及び被殻にSVG-TH細胞を移植したときのパーキンソン病スコアの改善の時間経過を示す。

具体的態様の説明

本発明は、概ね不死化ヒト胎児中枢神経系細胞由来細胞系列、及びこれらの細胞系列の中枢神経系障害の治療における使用法に関連する。特に本発明の細胞系列及び方法はパーキンソン症候群などの中枢神経系における欠損に引き起こされる障害の治療に使用できる。

1. 治療方法

一態様において、本発明は中枢神経系由来の不死化ヒト胎児細胞の移植により、中枢神経系障害により苦痛を受ける宿主の治療、または障害の症状を軽減の方法

を提供する。移植組織拒絶、激脳炎、及び腫瘍形成は本細胞の中樞神経系への移植の後発生しなかった。さらに、この細胞は神経の移動（マイグレーション）及び軸索伸長の誘導を示した。これにより細胞は神経反応を刺激する栄養因子生産において機能した。

不死化ヒト胎児中枢神経系由来細胞の移植は多くの治療手段を提供する。例えば、パーキンソン病は疾病に冒された宿主の基底神経節へのこれらの細胞の移植により治療できる。移植細胞により生産される栄養因子はドーパミン作動性神経の死を阻害することが可能であるだけでなく、ドーパミン作動性神経の再生を誘導する。ドーパミン作動性神経数の増加はパーキンソン症候群により苦痛を受ける人の臨床的改善を提供する。

追加的態様において、移植細胞は神経的関連ポリペプチドをコードする核酸を導入できる。「神経的関連ペプチド」という単語は概ね中枢神経系の組織内部での反応を触媒するペプチドまたは蛋白質を言及する。これらペプチドは神経ペプチド、蛋白質または酵素に自然に存在できる、または中枢神経系内部で治療活性を有するペプチドまたは蛋白質断片でよい。例は神経成長因子、及び重要な神経化学物質の生産の触媒に使用される酵素、またはそれらの中間産物を含む。特に好ましい面においてこの細胞はチロシン水酸化酵素をコードする核酸を導入されているだろう。チロシン水酸化酵素はチロシンをL-ドーパに変換する酵素で、ドーパミン生産の律速段階である。それにより、移植細胞によるチロシン水酸化酵素の発現によりこれらの細胞はドーパミンを生産及び分泌する。さらに、神経再生の誘導に加え、移植細胞は黒質におけるドーパミン濃度の上昇及び、ドーパミン作動性神経損失の影響を制限または覆す可能性がある。

本発明の方法は、ハンチントン舞蹈病、アルツハイマー病、または多発性硬化症などの他の神経障害の治療にも使用できる可能性がある。不死化ヒト胎児神経由来細胞は中枢神経系（CNS）と共存できるため、これらの細胞は他の障害治療に効果を及ぼすために、生理活性ペプチドをコードするDNA配列を導入してCNSに移植してもよい。例えば、ハンチントン舞蹈病及び筋委縮性側索硬化症においてはこのペプチドはグルタミン酸等の神経伝達物質刺激を遮断できる。多発性硬化症の治療に応用するときは、例えば、このペプチドは特に、オリゴデンドロサイ

トの死を遮断する血小板由来成長因子または毛様体栄養因子等の有髄化の栄養刺激物質であろう。これらの疾病は局部病変というより汎性であるため、別の移植法が望ましい。例えば、細胞は脳脊髄液に曝される表面に移植してよい。発現及び分泌の後、ペプチドは脳脊髄液の自然循環により脳表面全体に流されるだろう。移植に適した場合は脳側室、腰椎包膜領域(lumbar thecal region)、及びその類似を含む。アルツハイマー病においては、細胞はRosenberg et al.により示されたように基底前脳支持神経に神経成長因子を生産するように導入してよい(Rosenberg et al., Science, 242:1575-1578(1988)、参照により本明細書中に援用する)。

本発明の方法は外神経への細胞の移植による宿主の処理にも適用されるだろう。本発明のこの具体的態様は宿主の予防的処理に特に有用である。不滅化したヒト胎児神経由来細胞に疾病関連抗原、例えばHIV gp120ポリペプチド等の、例えば米国特許第5,166,050に記載されるようにHIVの主な中和化ドメインを含むペプチドをコードするDNAの形質導入を行う。その細胞は発現し、形質導入したDNAにコードされる抗原を分泌するだろう。抗原は移植した細胞により断続的に分泌され、強い免疫反応を誘導する。宿主を完全に免疫化するのに適当な時間間隔をおいたあと、細胞を除去すればよい。

ここにおいて使用したように、「宿主の処理」には、疾病の過程のうちの予防的介入、緩和的介入、および治療的介入が含まれる。ゆえに、ここで使用した「処理」という用語は処置が望まれるような疾患の症状を軽減または除去することを意味する。ここで使用した「宿主」という用語は一般的に、特定の処理に対し受容者となる人類、非ヒト霊長類、げっし類、などのすべての温血哺乳類をさす。典型的に、「宿主」および「患者」という用語はここでは互換的にヒト患者を指して用いられる。

さまざまな疾病および症候群が本発明の方法により処置されるだろう。一般的に疾病とは、パーキンソン症候群（パーキンソン病を含む）や、アルツハイマー病、ハンティングトン舞蹈病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ゴーシェ病、テイーサックス病、神経障害（ニューロパシー）、脳腫瘍、などのような神経

学的疾病であろう。本発明の方法は非神経学的疾病の処理においても適用される。例えば、本発明の方法はウィルスや、細菌、原生動物などのような感染症に対して宿主を免疫化するために用いられる。不滅化したヒト胎児神経由来細胞に生理学的に活性のあるペプチドまたは免疫学的抗原基を含むペプチドをコードするDNAを形質転換する。本発明の方法はペプチド産生細胞を移植することにも使われ、宿主に対し成長ホルモンのような他の型のペプチドの生体内での断続的供与を供給する。

2. 細胞系列

A 一般論

上記の処理方法を実践する目的で、本発明では宿主または患者に移植するのに適した細胞系列を提供する。

一般に本発明の方法で移植した細胞は不滅化したヒト胎児神経由来細胞である。「神経由来」ということは、この細胞は不滅化する前は神経細胞の表現型を有する、または神経細胞型への分化すべき胚細胞である。神経細胞型にはニューロン、星状細胞、乏樹状突起（オリゴデンドロサイト）、脈絡膜叢(choroid plexus)、上皮細胞などが含まれる。

不滅化胎児細胞系の調製は一般に後に示す手順により行われる。胎児細胞は選択的妊娠中絶のあと回収される。妊娠中絶後の胎児提供女性に対し、定型的にヒト免疫不全ウィルスやB型肝炎ウィルス、C型肝炎ウィルス、メガロサイトウィルスおよび、1型および2型肝炎ウィルスを含む種々の感染病に対しての血清学的スクリーニングを行う。胎児は一般に9から11週の妊娠期間（着床後7から9週間）の齢である。胎児齢は超音波により確かめられる。胎児は胎児の脳の外傷を最も小さくするように超音波測定による誘導に従い、出外される。

胎児出外後、胎児の脳は流産児より切開し同定される。細胞は次のように調製される。脳組織は19番のゲージ針を通じて吸引され、イーグル最少培地（E-MEM, Gibco, New York, N.Y.）中で2度洗浄される。細胞はポリDリジン処理（0.1mg/mlで5分間）した培養皿上に広げられる。細胞は20%胎児牛血清、75 μ g/mlストレプトマイシン、75ユニット/mlペニシリン、1%デキストロースおよび2 μ g/mlフ

ファンギゾン (fungizone) (Gibco) を供給した E-MEM 上で成長する。不滅化前、細胞は 5% 二酸化炭素中で 37 度に温度調節した環境に保温される。当業者は、他の細胞の処理の方法も用られることを認識するであろう。

本発明の方法により移植される細胞はさまざまな技術により不滅化されることが可能である。特に、次にあげるように細胞は不滅化されるだろう。細胞培養は一般に始原神経細胞およびグリア細胞 (progenitor neuronal and glial cells) 並びにニューロン細胞を、ここで参考文献として援用する Major and Vacante, J. Neuropath. and Exp. Neurol. 48:425-436 (1989) に記載されているように調製する。普通の培地交換により脳細胞は数カ月生き残るが、ほとんど増殖しない。しかし、細胞は SV40 欠損変異体の感染により形質転換される。変異 DNA には複製開始点 (ori)

が欠損しており、増幅できない。DNA の感染は Gluzman, Cell, 23:175-182 (1981) に記載されるように細胞を無制限に増殖するように形質転換するだろう。胎児細胞の 3 週間の培養増殖の後、フラスコ当たり $100 \mu\text{g}$ の SV40ori-変異体を含むプラスミド DNA (pMK16) を Graham et al. Virology, 52:456-467 (1973) に記載されるように、リン酸カルシウム沈降技術を用いて形質導入する。代替的に細胞はエレクトロポレーション、またはここで参考文献として編入した Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988, に記載されるように他のよく知られた技術により形質導入されだろう。形質導入のあと、培養細胞は毎週培地交換しながら培養される。数週間の後、プレートの分離した領域でのグリア細胞の増殖が明瞭になる。その細胞はトリプシン処理 (0.025%) することにより新しい培地に移される。形質転換した細胞は形質転換細胞に発現している SV40T タンパク質を検出する蛍光抗体検定により同定される (図 2)。細胞は 10 日毎に T タンパク質陽性細胞の数の増加がみられるまで移動する。

形質転換した細胞は連続的細胞系列の表現型を示すだろう。特に 18 時間の世代時間で高い飽和濃度まで増殖するだろう。細胞は形質転換した表現型も支持体に依存しない増殖も示さないが、これは非変異体 SV40 で形質転換した細胞と同じ特徴である。細胞の形状も細胞系列の樹立の経緯で変化がみられない。細胞のフ

フォーカスは一般に検出されない。特に有用な細胞に、ここで参考文献として援用する米国特許第4,707,448号に記載されたアメリカン・タイプカルチャー・コレクション、Rockville MD, (A.T.C.C. CRL 8621)に寄託されたSVG細胞系列由来のものが含まれる（図1）。以下においては、「SVG細胞」または「SVG細胞系列」とは細胞系列A.T.C.C. CRL8621由来の細胞または細胞系列を意味する。誘導体は細胞系列A.T.C.C. CRL8621のサブクローン、複製体、または遺伝的改変変異体を意味する。

別法として、細胞は該当技術分野において既知の他の技術によっても不滅化されるだろう。例えばEpstein-Barrウイルスによる不滅化がここで参考文献として援用する米国特許第4,464,465号に記載されたように適用できるだろう。複製開始点OriPおよびOriLytを欠損したEpstein-Barrウイルス変異体は特に有用である。他の有用な不滅化の方法はここで参考文献として援用する Bartlett et al .

, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:3255-3259 (1988) に記載されたようにC-mycのような成長の制御を行う細胞性遺伝子の過剰発現である。一般に移植に適した形質転換した細胞は足場依存性(anchorage dependent)であり、軟らかい寒天培地上では成長しなく、細胞増殖巣（フォーカス）の形成は示さないであろう。

形質転換した細胞の組織学的起源は決定されるだろう。典型として星状細胞はグリア繊維酸性タンパク質、GFAPからなる中間径繊維の存在により認識出来る。他方、乏樹状突起細胞（オリゴデンドログリア）はミエリン産生細胞であり、ミエリンの構成成分であるガラクトセレブロシド、gal Cの合成により同定できる。

形質転換後、細胞は移植のために処理される。細胞は細胞培養培地（例えばEagle最少培地）またはリン酸緩衝液のような生理学的に許容される媒体に懸濁する。細胞濃度は一般に 10^4 から 10^7 細胞/mlである。細胞の懸濁液は移植に先立ち緩やかに振蕩した。移植する細胞懸濁液の量は移植部位、処理目的、および溶液の細胞濃度に依存している。典型的には、患者または宿主に移植する細胞の総量は「治療有効量」であろう。ここで使用する治療有効量とは、ある処置が必要と

される疾患に対する処置に効果を有するのに必要とされる移植細胞の数を意味する。例えば処置がパーキンソン症候群に対して行われるとき、治療有効量の細胞の移植により、たとえば硬直、無運動および歩調異常などの異常に関わる徴候の回数および／または深刻さは減少されるだろう。パーキンソン症候群の場合、典型的には有効量を移植するために $5\mu\text{l}$ から $60\mu\text{l}$ の細胞の懸濁が各注射において施される。数回の注射が各宿主に使用されるだろう。当業者は適切な細胞量の決定方法を理解するだろう。

代替的な望ましい本発明の具体的態様において、移植に対し有用な細胞は、神経学的に適切なペプチドをコードする異種核酸配列を感染させ、発現させることが可能な細胞である。ここで核酸配列を記述するために用いた「異種」という用語は、一般にその配列を感染させた細胞系列内に元来存在しない配列のことを意味する。ゆえに異種配列は、その細胞系列にとって完全に異種のセグメントを含んでもよく、あるいは非天然的状态で細胞系列内に取り込まれた天然セグメントを含んでもよく、例えば非天然プロモーター／エンハンサー配列と結合したり、

その配列断片と一般的に結合しない天然プロモーターと結合したり、または通常1コピーまたは1コピーもないような細胞系列において、多コピーで供給したり等、非天然な方法で細胞系列中に取り込まれた天然配列から構成される。

一般的に核酸配列は転写プロモーターおよび転写終結配列に機能可能なように連結される。他のDNA断片との機能的関連の中に置かれた時、DNA断片は機能可能に連結されている。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは配列の転写を活性化したらコード配列に機能可能に連結されており、ポリペプチドの分泌に関わる前タンパク質として発現する場合、シグナル配列としてのDNAがポリペプチドをコードするDNAに機能可能に連結されていることになる。一般的に機能可能に連結したDNA配列は連続的（コンティギユアス）であり、シグナル配列の場合には連続的で且つ読み枠内にある。しかしながらエンハンサーはそれが転写の制御をしているコード配列と連続的である必要はない。連結は有用な制限酵素部位または代わりに挿入したアダプターまたはリンカーによる結合反応により成し遂げられる。DNA配列は転写エンハンサーにも連結される。移植した細胞におけるDNAの

発現は構成的または誘導可能であろう。既に参照により援用したSambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988, に記載された、プラスミドベクターpTK2, pHyg, およびpRSVneo, サルウイルス40ベクター、ウシパピローマウイルスベクターまたはEpstein-Barrウイルスベクターなど、これらの特性を有する種々の発現ベクターが細胞への感染のためにDNAを運ぶだろう。ベクターは細胞にエレクトロポレーションや、リン酸カルシウム媒介感染、ポリブレン感染などの標準的方法により導入される。

一般に、核酸にコードされるペプチドはハンチントン舞踏病の処理における動作阻害剤のような直接的に治療作用を発揮する化合物である。別の例では、そのような核酸によりコードされるペプチドは、宿主の体の内在組織による生産が損なわれた結果、特定の症状の原因となっているペプチドを、補充または置換するように選択される。その場合、細胞系列はペプチドの人口供給源となる。別の例では、ペプチドは治療的にまたは神経学的に関連のある化合物の生産を触媒するものでもよい。この場合も、このような化合物は宿主の系に外来でもよく、あるいはその合成経路が損傷された内在性の化合物でもよい。後者の場合は宿主のC

NS中でのペプチドの生産は、該化合物の生産の補助経路を提供する。例えば、望ましい具体的態様において、不滅化したヒト胎児神経由来細胞系列は、チロシンヒドロキシ化酵素をコードする核酸で感染させる。チロシンヒドロキシ化酵素はチロシンからドーパミンの合成を触媒する。ドーパミンはパーキンソン症候群の処理において効果があることが示されている。

特に望ましい面において、チロシンヒドロキシ化酵素をコードする核酸を感染させたヒト胎児神経由来不死化細胞系列は例えば、参考文献として援用する米国特許第4,707,448号に記載されたアメリカン・タイプカルチャー・コレクション、Rockville MD, (A.T.C.C. CRL 8621) に寄託されたSVG細胞系列由来のものなどのSVG細胞系列となるであろう（図1）。そのような細胞系列ここではSVG-TH細胞系列と呼ぶ。さらに望ましい一面において、SVG細胞系列はpH/Neoプラスミドにより感染される。

核酸は神経成長因子、阻害的成長因子、または脳腫瘍の処置に有用なサイトカ

インなどの栄養因子もコードするだろう。

神経の再生およびドーパミンの産生および分泌を増強するそれらの能力のため、本発明の細胞系列はパーキンソン症候群の様な宿主のCNSにおけるドーパミン産生細胞の欠損に関わる中枢神経系の疾患の処置において特に有用である。驚くべきことに、本発明の細胞系列は付加的な神経伝達物質をも産生することが可能であることが見いだされた。特に好ましい具体的態様において、例えば本発明の細胞系列はセロトニンの発現もまた可能である。セロトニンは人被験者において臨床医学的鬱病の発生に関わる。特に中枢神経系組織におけるセロトニンレベルの増加は、鬱病の症状を軽減することや、例えばProzac™の様な多くの抗鬱薬処理の基礎を築くことが見いだされてきた。このように、本発明の細胞系列は鬱病のようなCNSに於けるセロトニンレベルの低下による疾患の処置法に対しても有用である。一般的に、これらの方法は神経系の疾患の処置に関してここで記載した方法と本質的に同じかまたは類似している。

パーキンソン症候群患者に対し、本発明の細胞系列はドーパミンの分泌および神経の再生により疾患の徴候が軽減することに加え、セロトニンの分泌により鬱病の処置をするという二重の利益が有る。

3. 細胞系列の移植

一般的に本発明の細胞系列由来の細胞は脳の実質の蜘蛛下の空間または脳室または外神経のような脳脊髄液を含む空間に移植されるだろう。ここで用いた「外神経」とは腹腔神経節または座骨神経のような宿主の中枢神経系または末梢神経組織に含まれない領域を示すことを意図する。「外神経」領域は末梢神経を含みうる。「中枢神経系」は硬膜の中の全ての構造を含むものを意味する。

脳の内部に細胞は移植されると、両方ともここで参考文献として援用する Leksell and Jernberg., Acta Neurochir., 52:1-7(1980) および Leksell et al., J. Neurosurg., 66:626-629(1987) に記載されたように、立体定位法 (stereotaxic method) が一般的に用いられる。標的領域の部位決定は一般にここで参考文献として援用する Leksell et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 48:14-18(1985) に記載されたように移植前MRIを含む。標的の座標は移植前MRIにより決定される。

移植に先立ち、ここで参考文献として編入したBrundin et al., Brain Res., 331:251-259(1985)に記載されたように細胞の生存率は評価される。簡単にのべると、細胞の懸濁の試料分注($1-4\mu\text{l}$)はスライドガラス上でアクリジンオレンジとエチジウムブロマイドの混合(0.9%サリン(Sigma)中、 $3.4\mu\text{g/ml}$ の各化合物)と混合される。懸濁液はヘモサイトメーターに移され、390nmのエピ照射下において蛍光顕微鏡を用いて、計測小室グリッドを可視化するために白色光のトランス照射と組み合わせて、生細胞および非生細胞が可視化され数えられた。アクリジンオレンジは生細胞の核を緑色に染色し、エチジウムブロマイドは死細胞に取り込まれ、オレンジ-赤色の蛍光を発する。細胞の懸濁物は一般的に98%以上の生細胞を含まなければならない。

注射は一般的に滅菌した23-27ゲージ針を有する $10\mu\text{l}$ ハミルトンシリンジを用いて行われる。細胞を含んだシリンジは立体定位法法のフレームに直接接続される。注射針は頭蓋骨に空けた小さな穴を通じて前もって決めた座標まで押し下げられ、 $40-50\mu\text{l}$ の懸濁液が約 $1-2\mu\text{l}$ /分の割合で注入される。そしてさらに2-5分間の拡散をおこなわせてから、ゆっくりと針を取り除く。しばしば針の一刺しに

沿って1-3mm離れた2つの独立の細胞移植が行われる。そして、一回の手術で容易に5箇所までの移植細胞を標的領域に分散させて移植できる。注射は手動でまたは注入ポンプを用いて行われるだろう。針の除出後の外科手術の完成において、宿主は枠から外され、傷口は縫合される。必要に応じて、抗生物質による感染防止処置または免疫抑制の処置を行う。

より一般的な神経学的疾患の処置に対し、細胞は治療用化合物を脳髄の空洞または腰神経包膜において発現するように感染させられる。細胞により治療用化合物が分泌されると、通常の脳脊髄液の循環により治療用化合物は中枢神経系の中を通じて洗い流され、全身性の治療手段を提供する。空洞への移植は、両方ここで参考文献として援用するMadrazo et al., New Engl.J.Med., 316:831-834(1987)またはPenn et al., Neurosurgery, 22:999-1004(1988)に記載されたような暴露方法により実行してもよい。腰神経包膜への細胞の移植は、腰部への穿刺によるX線写真コントラスト溶液や抗癌剤の注入に類似の標準の方法により最も簡便に

実行される。

ある例では、本発明に従い外神経部位に細胞を移植することが望ましい。細胞は経皮的に針または内視鏡または暴露方法により移植される。当業者は、いつでもそれぞれの実用に応じて最適な移植法を認識するであろう。

移植に先立って細胞は膜に封入され得る。封入することは宿主の免疫系に対する障壁となり、移植片の拒絶および炎症を阻害する。細胞を包むためのいくつかの方法が用いられ得る。いくつかの例に於ては細胞は個々に封入される。他の例に於ては多くの細胞が一つの膜の中に封入される。移植の後、細胞が取り除かれるときには一つの膜に多くの細胞が封入された構造の比較的大きなサイズは移植された細胞の除去のための簡便な手段を提供する。細胞の封入法のいくつかは当該技術分野に於てよく知られており、それぞれが本明細書に於て参考文献として援用する欧州特許公開番号301,777または米国特許番号4,353,888、4,744,933、4,749,620、4,814,274、5,084,350、または5,089,272に、記載されているようなものである。

細胞封入の方法の一つは次のようなものである。形質導入された細胞はアルギン酸ナトリウム（多価陰イオン性海藻抽出物）と混合され、例えば塩化カルシウムのような2価の陽イオン溶液中に押し出され、その陽イオンはアルギン酸ナトリウムと複合体となり、ゲルを作ること、細胞を含んだゲルビーズまたはドロップを形成する。ゲルビーズは高分子量（分子量 $60-500 \times 10^3$ ）濃度（0.03-0.1%重量/容量）の、ポリ-L-リジン等のポリアミノ酸とともに短時間（3-20分）インキュベートされ、膜を形成する。形成されたカプセルの内側はクエン酸ナトリウムで処理され、再度液化される。細胞を囲む単一の膜は透過性が高い（分子量cut off 200から 400×10^3 ）。細胞を含む単一膜のカプセルは塩溶液中に1から3時間インキュベートされ、捕らわれたアルギン酸ナトリウムがカプセルの外に拡散し、平行状態に達するまでカプセルを拡大させる。この結果できた、アルギン酸ナトリウムをあまり含まないカプセルは、ポリ-L-リジン（PLL）またはキトサン（脱アセチル化キチン；分子量 240×10^3 ）等の低分子量のポリアミノ酸（分子量 $10-30 \times 10^3$ ）と反応させられ、相互作用した、より透過性の低い膜（分子量cut of

f 40から80X10³)を作る。二重膜に封入された細胞は上述のようにEMEM中で2から3週間培養される。

アルギン酸ナトリウムによって具体的説明を行うが、それが置かれる媒体中での条件の変化によってゲル化し、形を保てる大きさを形成することの出来るいかなる無毒性の水溶性物質も用いられ得ることは当業者に認識されるであろう。そ

のようなゲル化物質は一般的に、簡単にイオン化して、反対の電荷を持った多量体にさらされた時に表面層が架橋されて永久的な膜を形成させられるような陰イオンまたは陽イオン基を形成できるようないくつかの化学的部分を含む。天然および合成の大部分の多糖類性樹脂はアミノ基のような正電荷を持った反応基を含む多量体によって架橋され得る。アルギン酸樹脂と反応し得る生体適合性の架橋性多量体はポリリジンおよびその他のポリアミノ酸を含む。形成される膜の透過性の程度は望ましい分子量を有するポリアミノ酸の注意深い選択によって調節され得る。ポリ-L-リジン (PLL) は好ましい多量体物質であり、他にもキトサンおよびポリアクリレートも好ましい。分子量は典型的には約10⁴から約10⁶の範囲である。

本発明は以下の実施例によってさらに説明される。これらの実施例は単に本発明の側面を描くためのものであり、本発明の限定を意図したものではない。

実施例1-SVC細胞の調製

本実施例はベンガル猿に移植するためのSVC細胞 (A.T.C.C. CRL 8621) の調製を記載する。細胞はマイコプラズマ、HIV-1、B型肝炎ウイルス、ウイルス、シミアンウイルス40、ヘルペスシンプレックスウイルス、サイトメガロウイルス、およびJCウイルスによる感染について検索された。

SVC細胞は集密状態 (コンフルエント) まで培養された。細胞増殖は足場依存性であった。フォーカス形成は起こらず、細胞形態は均一であった。細胞はハンクスのバランス塩溶液に0.05%トリプシン0.01M EDTA (Versene 緩衝液) を加えたものによって消化することで組織培養皿から除かれた。細胞は遠心分離によって集められ、3回洗浄され、リン酸緩衝液に再懸濁された。最終細胞濃度は10⁶細胞/mlであった。細胞懸濁液は移植まで4℃で保存された。

実施例2-SVG細胞の移植

本実施例は6体のベンガル猿の脳基底核へのSVG細胞の移植を記載する。移植は外科的な複雑さを伴わない立体定位法によって行われた。動物は始めケタミンによって麻酔され、外科手術の間イソフルオリンによるガス麻酔によって維持さ

れた。動物は立体定位枠（コップ）内に置かれ、移植のための目印は立体定位座標によって確立された。中心線を確立するために上矢状静脈洞が露出された。目印は両側の尾状核(caudate nucleus)および果核(putamen)を覆う頭蓋上に置かれた。座標は以下のとおりであった。APは0の前+24mmであった。側方の座標は尾状核の中心線から5mm、果核の中心線から10mm側方であった。

5つの粗い穴が開けられた。1つは上矢状静脈洞上に、2つが尾状核上に、2つが果核上に開けられた。2つの異なる移植法が用いられた。

1. 26ゲージ針を取り付けた $10\mu\text{l}$ ハミルトン注射器または23ゲージ針を取り付けた $50\mu\text{l}$ ハミルトン注射器が用いられた。脳の右側にSVG細胞は移植された。注射器を用いて2か所に配置が行われた。1つは側方果核中に2つ目は中心果核中に配置された。針は皮質から18mmの深さにさしこまれ、コップ微小注入器によって $10\mu\text{l}$ の細胞懸濁液が移植された。最初の移植の後、針は1分につき1mmの速さで3mm抜き取られ、その後 $10\mu\text{l}$ の細胞懸濁液の注入が行われた。2度目の注射の後、針は1分につき1mmの速さで抜きとられた。2度目の移植は反対側の果核中の同一座標において同一の技術を用いて行われた。果核に注入した後、尾状核中への移植が同じ細胞懸濁液を用いて行われた。尾状核中に2回の注入が、側方および中央に対して行われた。注入の深さは15mmであり、 $10\mu\text{l}$ が移植された。注射器は1分につき1mmの速さで3mm引き抜かれ、 $10\mu\text{l}$ の細胞懸濁液の2度目の注入が行われた。形質転換されていないSVG細胞が果核に移植され、チロシン水酸化酵素遺伝子で形質転換されたSVG細胞が尾状核に移植された。細胞の濃度は 1ml につき 2×10^6 細胞であった。

2. 針付き注射器による移植の使用に加えて22ゲージ針にblue peak 管套管を取り付けたものが構築された。管はデッド容積が0の接続器を用いて1cc ツベルクリン注射器に取り付けられた。標的への挿入に続いて注入に先立って針

は15分間立てられた。細胞懸濁液が入ったハーバード (Harvard) 注入ポンプを0.2 μ l /分で作動開始させた。0.2 μ l /分で15分間注入した後速度は0.4 μ l /分に上げられ、100分間続けられた。注入の終了後、針は引き抜かれる前に30分間その場に残された。針は非常にゆっくり脳から引き抜かれた。傷は濯がれ、解剖学的層の中に閉じられた。動物は麻酔から覚まされ、手術の20分後に彼らの檻に移

された。

実施例3—猿に対するSVG細胞の移植

本実施例は移植1カ月後に殺された2体の猿中に、移植されたSVG細胞が効果的に定着 (engrafting) されたことを示す。移植された細胞は組織学的に健康であった。炎症や腫瘍形成の証拠はなかった。移植された領域の脳組織は以下のように調べられた。組織病理学的研究のために、動物はペントバルビタールの過剰投与 (460mg, i.v.) によって殺され、上行大動脈を通じて10%ホルマリンに続いて15 mlの氷冷リン酸緩衝溶液 (PBS) を散布された。脳は迅速に除去され、6mmの頭部切片に切られ、30分間同じ固定液中で固定された。組織切片は30%蔗糖PBS中で48時間濯がれ、迅速に-70℃で凍らされた。組織は凍結ミクロトーム内で40 μ mの頭部切片に切られ、一連の切片はPBS中に集められた。切片はチロシン水酸化酵素、グリア繊維酸性タンパク質およびTタンパク質に対する抗体によって免疫組織化学的に処理された。TH-IRについて調べられた切片に隣接する切片はヘマトキシリンおよびエオシンによって染色された。移植片を含んだ組織のうちいくつかの塊は5 μ mのパラフィン切片に切られ、上記のように染色された。

図3は猿の基底核中の針の痕を低倍率で示している。高倍率での針の痕の図 (図4-5) は針の痕の中の生きたSVG細胞を示している。それらの細胞は試験管内のSVG細胞に見られる多くの核小体を持つ大きな核によって容易に同定される。移植された細胞の形態は周囲の細胞の形態と著しく異なる。炎症性の細胞および腫瘍形成は同定されなかった。

移植9カ月後に殺された猿において同じ試験が行われた。移植片は同定され、炎症性細胞または腫瘍形成の証拠は全く発見されなかった。このことは細胞が定

着し、宿主によって拒絶されなかったことを示唆する。

実施例4—定着したSVG細胞のMRIによる評価

本実施例は残りの4体の猿における移植1カ月後の脳MRIによる評価を記載する。どの猿においても腫瘍形成の証拠は全く存在しなかった。

麻酔の導入後、猿は標準的なMRI枠内に置かれた。T₁およびT₂重率化されたコ

ントラストのない像およびガドリニウムを伴ったT₁重率化された像が1.5テスラ磁石 (Signa) を用いて撮られた。走査は腫瘍または結節形成の証拠が全くないことを明らかにした。

実施例5

本実施例は移植されたSVG細胞が中枢神経系において機能していることを示す。宿主の神経細胞（ニューロン）は移植された細胞に向かって移動し、宿主起源のドーパミン性神経細胞体およびドーパミン性神経突起は移植された細胞に向かって伸びた。実施例2に示したようにSVG細胞を移植された猿のうち2体が記載されたように殺された。脳は上記のように完全なまま取り除かれ、切片にされた。

各切片はゼラチンで被覆されたスライドガラス上に置かれた。代表的な切片はヘマトキシリンおよびエオシンで染色され解剖学的に特徴づけられた（図6）。移植された細胞は多数の核小体を持つ大きな核を伴うSVG細胞の特徴的な形態を示した。隣接した切片はグリア繊維酸性タンパク質（GFAP）、SV40のTタンパク質、またはチロシン水酸化酵素のいずれかに対するモノクローナル抗体によって染色された。切片はヘマトキシリンのみによって対比染色された。図7は星状細胞系列の細胞質タンパク質であるGFAPに対する抗体で染色された隣接する切片を示す。星状細胞性の起源は濃い細胞質の染色によって示される。細胞の起源は抗Tタンパク質抗体によって染色された移植された細胞を明確に示した図8によっても示される。

尾状核および果核中の移植された細胞は生存しており、上記のように抗Tタンパク質抗体によって容易に同定された。SVG細胞はまた全ての猿の側脳室の壁上にも見られた。ドーパミン性神経細胞（ニューロン）は移植された細胞に向かっての神経突起の伸長を示した（図10は生体内で抗チロシン水酸化酵素抗体によっ

て染色されたSVG細胞層内のチロシン水酸化酵素神経細胞（ニューロン）を示す。）ドーパミン性神経細胞体(neuronal body)もまた移植されたSVG細胞の領域内に存在した。神経突起の伸長および神経細胞体の存在はSVG細胞が神経細胞（ニューロン）の移動および神経突起(neuronal processes)の伸長を引き起こす神経栄養因子を生産したことを示唆する。

どの切片においても炎症、移植片の拒絶、腫瘍または結節の形成の証拠は見られなかった。

実施例6-SVG細胞の封入

本実施例はSVG細胞の個々の封入および移植のための細胞の調製を記載する。細胞はアルギン酸ナトリウム沈澱内に封入される。

SVG細胞は培養皿中で集合するように増殖させられた。細胞はダルベッコのリン酸緩衝溶液（PBS）に0.05%トリプシンおよび1mM EDTAを溶かしたものによって培養皿から取り除かれた。細胞はMgCl₂、CaCl₂、0.1%グルコースおよび5%牛胎児血清を足したPBSに懸濁された。細胞は遠心分離によって集められ、上記の懸濁溶液によって2回洗浄され、遠心分離によって沈澱にされた。

遠心分離管の底に残った細胞沈澱は5mlの1.5%（重量/体積）アルギン酸ナトリウム溶液に懸濁された（Keltone LV(R), Kelco, Ltd., シカゴ, イリノイ）。懸濁液の球形のドロップは空気噴射式注射器ポンプドロップ製造機によって形成された。この装置によって細胞-アルギン酸ナトリウム懸濁液は、そこを通じて制御された割合（9L/分）で流れる、鞘を付けられた管（3mm I.D）の内側に位置する22ゲージ針を通じて射出される。注射器ポンプによって液体のドロップが針の先端から出されると（20cc/時間）ドロップは素早く流れる気流によって起こる激しい力によって引き剥がされる。直径約300-1000ミクロンの一様で球形のゲルドロップが形成されることを保証するために、針の先端はCaCl₂溶液の表面から8cm上に保たれる。

ゲルドロップの標本は目盛り付の接眼レンズを付けられた解剖顕微鏡（Wild Heerbrugg Model M8）を用いてその大きさおよび形態の一様性について調べられる。固定化された細胞を含むアルギン酸カルシウムゲルビーズが円錐形の底を持

った50mlプラスチック遠心分離管に移された後、ビーズはそれぞれ30mlの0.1% (重量/体積) CHESおよび1.1% (重量/体積) CaCl_2 溶液によって洗浄される。上清の体積はそれぞれの洗浄の後に真空吸引器によって減らされる。半透過性カプセル膜はゲルドロップを0.05% (重量/体積) のPLL水溶液 (PLLのM/V=22.000) と8分間反応させることで形成される。PLL溶液を加えた後遠心分離管は蓋をされ、

反応の間にカプセル同士が接着しないように、手で端から端に揺さぶられる。その結果できる直径300-1000ミクロンの微小カプセルはそれぞれ30mlの0.1% CHESおよび1.1% CaCl_2 、および30mlの生理食塩水2回によって洗浄される。封入された細胞は30mlの0.03% (重量/体積) アルギン酸ナトリウム溶液と4分間接触させられ、カプセルの外層が形成される。微小カプセルの内側は30mlの0.05Mクエン酸ナトリウム溶液で6分間処理することで液化される。直径400-1400ミクロンの微小カプセルは塩溶液中で数回洗浄されて過剰のクエン酸が除かれ、1mlずつ5つに分注される。分注したもののそれぞれは、isotemp Series 400 CO_2 培養器(413D型、Fisher Scientific Co., Nepean, Ontario)の中で、25立方cmの培養フラスコ中の10mlのDMEM培養液中で37℃で培養された。

実施例7-SVG細胞にチロシン水酸化酵素を発現させるための遺伝子工学

本実施例はチロシン水酸化酵素をコードした核酸によるSVG細胞の形質転換を記載する。チロシン水酸化酵素を発現するSVG細胞は形質転換の後の培養中に同定された。

SVG細胞株はチロシン水酸化酵素(TH)をコードする核酸によって形質転換された。プラスミドphTH-63はBluescript ベクター KS のEcoR1 切断部位にクローニングされた、チロシン水酸化酵素に対する2型のcDNAを持つ。THは二つの異なる真核生物の発現ベクターであるpcDNA/NeoおよびpRSV/Neo (両方ともInvitrogen, Corp., San Diego, CAより入手できる) にクローニングされた。TH cDNAを含むphTH-63のHindIII/BamHI断片はpcDNA/NeoのHindIII/HindI切断部位にクローニングされ、プラスミドphTH/Neoを生じた。同様に、TH cDNAを含むphTH-63のHindIII/SpeI断片はpRc/RSVのHindIII/SpeI切断部位にクローニングされ、プラスミ

ドpRSV-hTH/Neoを生じた。図11に見られるようにphTH/Neoはネオマイシン耐性を持ったプラスミド上のTH cDNAのすぐ上流に初期CMVプロモーターを持つ。pRSV-hTH/Neo構築物はネオマイシン耐性を持つプラスミド上のTH cDNAの上流にRSV LTRを持つ。

SVG細胞の分離された培養物が確立され、それぞれはphTH/NeoまたはpRSV-hTH/Neoのいずれかによって形質転換された。形質転換の後、細胞は500マイフログラ

ム/mlのゲネチシンを含む培養液中で2ヶ月間培養された。ゲネチシンに対する安定した耐性を持つ7つのクローンがphTH/Neo形質転換体より確立された。どちらの形質転換体もTHを生産することはできたが、pRSV-hTH/Neo構築を用いた場合はこのプラスミドのネオマイシン耐性マーカーの発現が弱いため、長期の安定なクローンは得られなかった。安定なphTH/Neo形質転換体の1つのチロシン水酸化酵素に対する免疫組織化学的染色は図12に見られる。クローンは30%から60%の範囲でTH陽性であった。40-60% TH陽性である1つのクローン1B1Bは増殖させられ、免疫組織化学を確かにするためにウエスタンブロットが行われた。図13に見られるようにTHに対するポリクロナール抗体をプローブとしてウエスタンブロットが行われた場合、約60kdに移動するバンドが検出され、これは2型THの大きさと一致した。1B1Bクローンは以後SVG-THと名付けられた。

SVG-TH細胞内に生物学的活性のあるTHがあるか否かを決定し、細胞によるLドーパの分泌があるか否かを決定するために細胞の培養上清に対してHPLC解析が行われた。HPLC解析のための細胞培養上清を採取する前に、TH機能に必要な補欠因子であるビオプテリン (BH4) 1mMとともに細胞を培養した。ビオプテリン非存在下で培養したSVG-TH細胞培養物の細胞培養上清並びにビオプテリン存在下と非存在下の両方で培養した親株であるSVG細胞株の培養物より得られた上清を対照に含めた。結果は以下の表1に示される。

表1

BH4存在下および非存在下で培養されたSVGおよびSVG-TH細胞培養物の上清中のL-ドーパ産生

L-ドーパ	SVG細胞	SVG-TH細胞
BH4非存在下	検出されなかった	検出されなかった
BH4存在下 (1 μ M)	検出されなかった	4-6pmol/ml/分

表1に示されたようにL-ドーパは親株であるSVG細胞培養物からはビオプテリンの存在下でも非存在下でも検出されず、またビオプテリン非存在下で培養されたSVG-TH細胞培養物からも検出されなかった。しかしながらSVG-TH細胞がビオプテ

リン存在下で培養された場合は約4-6pg/ml/分のL-ドーパが細胞培養上清中に産生された。このことは免疫組織化学およびウエスタンブロットで見られたTHが生物学的に活性があることを確かめた。

意外なことに、2つの顕著な他のピークもまたSVG-TH細胞培養物の上清のHPLC解析に、ビオプテリンを培養液に加えたか否かに関わらず見られた(図14)。これらの2つのピークは親株であるSVG細胞株中には見られなかった。一連の標準を用いて2つのピークの一方はセロトニンを表し、2つめのピークはセロトニンの分解物である5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)を表すことが決定された。これらの細胞にセロトニンが存在することを確認するためにセロトニンに対するポリクロナール抗体を用いてSVG-TH細胞に対する免疫組織化学が行われた。SVG-TH細胞はHPLCだけでなく免疫染色によってもセロトニンに対して陽性であった。これらの細胞株によるセロトニン産生は、セロトニンを産生するとは報告されていなかったグリア起源の細胞に特徴的であった。

SVG細胞を特徴づけたのと同じパネルの抗体を用いた免疫組織化学的方法でSVG-TH細胞は特徴づけられた。比較結果は以下の表2に示される。

表2

	<u>SVG</u>	<u>SVG-TH</u>
ビメンチン	+	+
GFAP	弱く+	-
MHCクラスI	+	+
MHCクラスII	-	-
Thy 1.1	+	+
Tタンパク質	+	+
セロトニン	-	+
1-dopa (HPLC)	-	+
NSE	-	-
ニューロフィラメント	-	-

SVG-TH細胞の電子顕微鏡を用いた研究により、親のSVG細胞系列には見られない粗面小胞体の顕著な拡大化が明らかになった(図15)。被覆小孔、ミトコンドリア、およびリボソームも容易に同定された。

実施例8-SVG-TH細胞による神経突起の伸長の促進

SVG細胞と同様に、SVG-TH細胞についても、神経突起の伸長の能力、および初期神経または神経細胞系列からの生き残りを促進する能力を試した。

A. hNT細胞系列の共培養

既に記載されているヒト奇形がん腫に由来する細胞系列が、SVGおよびSVG-TH細胞の共培養実験に使用された。この細胞系列は、親の細胞系列をレチノール酸(retinoic acid)および抗分裂試薬を組み合わせたものによって処理された親の奇形がん腫に由来するものである。処理後、親の細胞系列は分裂後神経細胞(post mitotic neuron)へと分化する。Andrew, P.W., Retinoic Acid Induces Neuronal Differentiation of a Cloned Human Embryonal Differentiation of a Cloned Human Embryonal Carcinoma Cell Line In Vitro, Dev. Biol. (1984) 103:285-293。hNT 神経と呼ばれるこれらの細胞は本明細書に記載されている共培養実験に使用されているが、ニューロフィラメントの発現および神経伝達物質の分泌を含む、神経の表現型的な性質を多く持っている。これらの細胞の維持には、

ラミニンまたはマトリゲルに覆われたプレート上に播くこと、および馴化培地で栄養を与えることが必要である。

3個の別々の実験において、SVG, SVG-TH, またはCos細胞をあらゆる細胞外マトリックスに覆われていない6穴プレートに播いた(1穴あたり 1×10^5 細胞)。SVG, SVG-TH, またはCos細胞を播いてから48時間後、それらは30%集密状態(コンフルエント)に達し、 1×10^5 hNT細胞が同じ穴に播かれた。hNT細胞はまた、上記の3種類の細胞系列の播かれていない、また細胞外マトリックスで覆われていない第4の穴にも播かれた。培養液は、2%ウシ胎児血清を含むD-MEMによってのみ栄養を与えられた。播いてから24時間後、いくつかのhNT細胞はSVG, SVG-TH細胞のない領域に接触し、またこれらの細胞に直接的にも接触した。大まかにみて同数のhNT細胞と、SVGまたはSVG-TH細胞がみられた。SVGまたはSVG-TH細胞とともに共培

養したhNT細胞には多数の小さな突起がみられた。hNT/Cos細胞の共培養では、hNT細胞は直接Cos細胞に接触したが、Cos細胞がない領域では見つけられなかった。僅か1%程度のCos細胞が、hNT細胞と接触しており、hNT細胞には突起がみられなかった。未処理の表面の上にhNT細胞のみを乗せた対照の皿は、接触した細胞は希にしか見られなかった。72時間後にはhNT細胞はCos細胞を離れて持ち上げられたが、対照皿にはhNT細胞は見られなかった。対照的に、SVGおよびSVG-TH細胞の両方とともに共培養したhNT細胞は接触を保ち、周りを覆っているSVG/SVG-TH細胞と接触した長い突起を送り出していた(図16A)。培養物のいくつかはアセトン/メタノールで固定し、2種類の細胞の総数を正確に区別するためにTタンパク質に対する免疫組織化学を行った(図16A)。これらの培養物は2週間生存を保ち、その後SVGおよびSVG-TH細胞は集密状態に達した。共培養液を新規のプレートに継代すると、同様の事象が再度見られた。更に2週間後、その実験を終了させた。

B. PC12の共培養

実験のこの部分では、PC12をSVG, SVG-TH, Cos細胞と共培養するか、または単独でプレートに播いた。hNTでの実験と同様に、SVG, SVG-TH, またはCos細胞を 1×10^5 /穴で、未処理のプラスチック容器の6穴プレートに播いた。48時間後にPC12

細胞を3種類すべての細胞系列上に巻き、同様に未処理のプラスチックにも単独で播いた。SVGまたはSVG-TH細胞とともに共培養してから48時間後、PC-12細胞は、SVGおよびSVG-TH細胞に直接接触するのと同様に、細胞のない領域にも接触した。PC-12細胞は神経突起を伸ばし、92時間後には周囲を覆うSVGおよびSVG-TH細胞と接触した。培養液のいくつかはアセトンおよびメタノールで固定し、2種類の細胞総数を区別するために、Tタンパク質に対する免疫組織化学を行った(図16B)。17日後、細胞は過剰成長し、実験を終了した。対照的に、Cos細胞とともに共培養したPC12細胞、または単離して共培養したものは突起を伸ばすことが不可能であった。

別の実験で、PC12細胞を、ポリ-d-リシンで覆ったプレートの上に播き、非馴化培地または、SVGまたはSVG-TH細胞培養液に由来する馴化培地により栄養を与えた。72時間後、馴化培地により栄養を与えられたPC12細胞は神経突起を伸ばし

たが、非馴化培地により栄養を与えた細胞はその形態を変化させなかった。

C. ラット胎児中脳神経細胞の初代培養

SVGおよび/またはSVG-TH細胞が初代神経細胞(ニューロン)の生存をも支えることが可能であるかを決定するために、E13ラット胎児由来の中脳を切断し、分離して6穴プレートに3箇所置いた。24時間後、Costar transwell chamberを穴の中に置き、SVGまたはSVG-TH細胞をtranswell chamberの上に播いた(1×10^5 細胞)。中脳培養液の中の1群は負の対照として、いかなる細胞とも共培養しなかった。7日後、細胞をtranswell chamber毎取り除き、穴の中の中脳培養液はアセトンおよびメタノールで固定し、生き残った中脳神経の数を決定するために、チロシンヒドロキシラーゼに対する免疫組織化学により染色した。図17に見られるように、SVG細胞と共培養した中脳培養液は、対照のプレートと比較して、2から3倍大きなチロシンヒドロキシラーゼ神経の生存を示した。同様の結果がSVG-TH細胞についても見つかっている。対照または共培養プレートにおいて、チロシンヒドロキシラーゼ陽性神経の形態に変化は見られなかった。

実施例9-齧歯類線条におけるSVGおよびSVG-TH細胞の移植および同定

SVGまたはSVG-TH細胞の移植体が線条へと移植可能であるか、そして移植後に

明確に同定されるかを決定するために、SVGまたはSVG-THの 5×10^5 個の細胞を、手順には立体定位頭部フレーム (stereotaxic head frame) 法を用いてSDラット (Sprague Dawley rat) の線条へと移植した。10個体の動物はSVG細胞を移植され、また10個体はSVG-TH細胞を移植された。移植後3日目または7日目に、動物は安楽死され、脳を免疫組織化学のために加工した。両群の5個体の動物については、安楽死時に4%パラホルムアルデヒドを用いて全身的に灌流させた。パラホルムアルデヒド固定された動物に由来する脳の切片はポリクローナル抗体による免疫組織化学に用いられ、他方で、固定されていない脳はモノクローナル抗体による免疫組織化学に用いられた。線条における移植されたSVGおよびSVG-TH細胞は、移植された細胞だけに見られるSV40 Tタンパク質の染色により、周囲の宿主組織から明確に区別され得た。さらに、免疫組織化学染色により確かめられるように、移

植された細胞は試験管内 (in vitro) で発現しているものと同一の抗原を生体内 (in vivo) で発現した。これらには、ビメンチン、セロトニン、ヒトMHCクラスI、Tタンパク質およびTHが含まれる。試験管内 (in vitro) で見られるものと同様に、生体内 (in vivo) では僅か40%のSVG-TH細胞がTH陽性であった。周囲の宿主組織もまたビメンチンおよびTHについて同様に免疫染色された。周囲の宿主組織は明らかにGFAP+星状膠細胞をもつ一方、SVG-TH細胞はGFAP-のままであった。ラットMHCクラスIに対する染色は、周囲の宿主組織血管、およびしばしば移植物中に見られた血管を染めたが、期待したとおり、移植された細胞は染めることができなかった。SVG-TH移植細胞の電子顕微鏡研究により、移植された細胞は、図15に見られるように、特徴的な膨張した粗面小胞体および被覆小胞をとどめることがわかった。SVG細胞はGFAP陽性であり、TH陰性であるという点を除けば、SVG細胞についても同様の結果が得られた。

実施例10-6-ヒドロキシドーパミンによる組織障害を持つSDラットの線条へのSVGおよびSVG-TH細胞の移植

SVGおよびSVG-TH細胞は線条で同定され得ることがわかったため、次の目的は、これらの細胞が、パーキンソン病のモデル動物における機能欠陥を修正することが可能であるかを決定することであった。

7個体のSDラットに、解剖学的に正しい部位に薬物を位置付けさせるために立体定位フレーム法を用いて、6-ヒドロキシドーパミンにより体の片側だけを冒す黒質の化学的組織障害を受けさせた。障害を与えて5週間後、その動物にアポモルヒネを投与し、除神経の度合を定量化した。図18に見られるように、全7個体の動物が、400回転/時またはそれ以上の基準回転速度を示した。障害を与えて6週間後、5個体の動物が、障害を受けた線条へ定着したSVG-TH細胞(約 5×10^5 個の細胞)を持っていた。残る2個体の動物は、線条へ定着したSVG細胞を持っていた。移植後1週間間隔で全4週間、それらの基準活性からの変化を決定するために、アポモルヒネを投与した。図18に見られるように、移植後1週間で、SVG-TH細胞が移植された5個体の動物においてみられる回転行為の量の実質的な減少が見られた。これに対して、期待されるように、SVG細胞を移植した動物は幾分かの有意

でない変化を示した、なぜなら、これらのラットはドーパミン作動性神経の伸長能力を欠き、SVG細胞がドーパミンを分泌できず、完全に神経が脱力されたためである。しかし次の3週間を終えると、図18に見られるように、SVG-TH細胞が移植された動物は次第に移植前の回転行為に戻った。

実施例11-移植後1カ月の定着細胞の同定

上記の実施例10に記載されている、7個体の6-ヒドロキシドーパミンにより組織障害を受けた動物は移植後1カ月で安楽死させた。3個体のSVG-TH細胞が移植された動物、および1個体のSVG移植動物は、安楽死時に4%パラホルムアルデヒドによって全身的に灌流させた。残る3個体の動物は安楽死時に灌流固定させなかった。パラホルムアルデヒド固定された動物由来の脳の切片はポリクローナル抗体による免疫組織化学染色に用い、他方、固定されなかった脳の切片はモノクローナル抗体による免疫組織化学染色に用いた。移植された細胞は、移植後1カ月でも、SV40 Tタンパク質、ビメンチン、セロトニン、およびTHに対する免疫組織化学染色により依然同定され得た。しかし、その移植体は、移植後3日または7日で見られた移植と比較して有意に小さいものであった。その移植体は、ラージTタンパク質、セロトニン、およびビメンチンに体して免疫染色されたが、しかし

TH免疫染色は、移植体においても、または周囲の脱力した線条においても同定されなかった。移植体はさらに、周囲の宿主柔組織において強く発現されている抗原、ラットThy 1.1に対する染色の欠落によって同定された。宿主柔組織は、移植体の周囲に目立った星状膠細胞増加を示した。切片をラットCD4およびCD8について染色したところ、多数の陽性細胞が移植体の中および周囲に同定され、これは移植体が免疫学的な拒絶を受けていることを示唆している。上記のデータは、その細胞は齧歯類CNSにおいて異種移植であることを示しており、その一方で、霊長類CNSにおいて9カ月以上細胞が生存したことは、その系においてこれらの細胞は同種移植であることを反映している。

実施例12-SVG-TH細胞移植のパーキンソン病障害スコアに対する効果

ヒトにおけるパーキンソン病と非常に良く似た実験条件は、アカゲザルへの1

メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)の投与によって模倣できる。図19-21は、パーキンソン病の症状を誘発するためにMPTP処理をおこなった3個体のアカゲザルの尾部および果核へのSVG-TH細胞の定着の効果を示す。移植に先立ち、サルは、パーキンソン病障害スコアが10(最高段階)に達し、注入後数カ月維持されるまでMPTP注入の投薬計画によって処理された。

移植の過程において、体積 10μ l中の750,000個の細胞が各個体の尾部および果核の4箇所それぞれに置かれた。グラフは、手術後の時間(日)に対するパーキンソン病障害スコアをプロットした。一週間以内で、全3個体のサルが、障害値の低下で反映される改善を示した。

	障害値	
	手術前	手術後
H002	10	3
H005	10	7.5
T022	10	5

H002番のサル(21日間の結果が図19に示されている)は今や移植後90日間持続しており、手術後いかなる時も、Sinemet(パーキンソン病の標準的な治療薬)の処

理を施していない。このサルにおける2-3という現在の障害値は、薬物治療をおこなっているパーキンソン病患者に期待される段階と同様のものであり、サルにおけるSinemet処理を越える改善を明示するものである。サルの手術前の状態と対照的に、自分自身で食事を摂取することが可能であり、非常に活発で活動的であり、環境に良く順応し、体重も増加した。

図20および21に見られるように、H005番およびT022番のサルもまたそれらの障害スコアに改善が見られ、まだ長い時間持続していないものの、改善が進行中である。

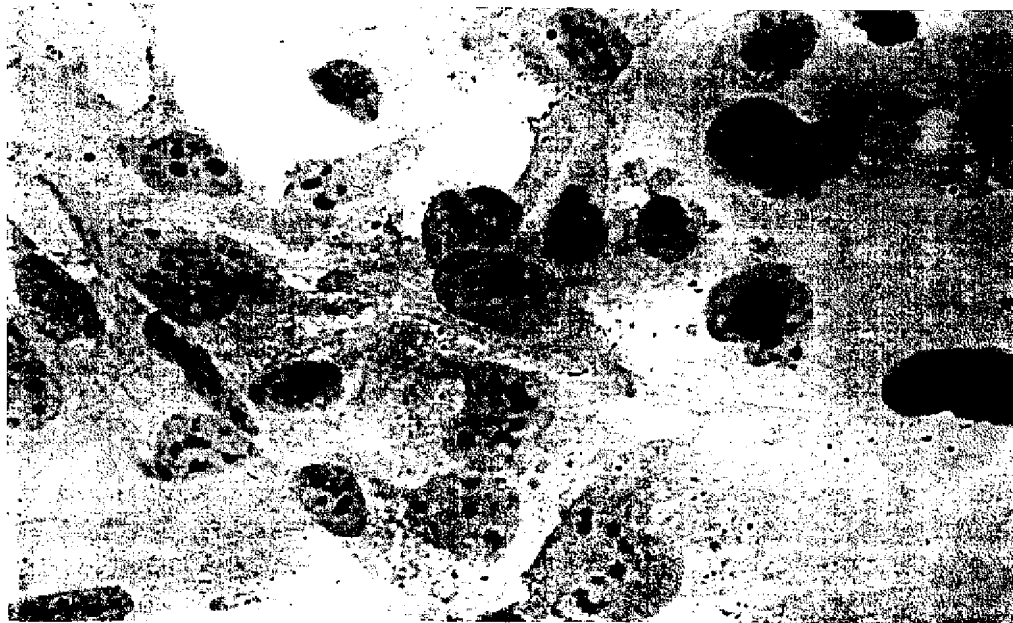
このように、SVG-TH細胞の移植は、MPTPによる組織障害によって誘発されたパーキンソン病の状態に実質的な改善をもたらす結果となる。

本明細書において言及されているあらゆる出版物、特許、および特許出願は、個々の出版物、特許、および特許出願の内容が明細書に具体的に記載されているのと同様に、参照により本明細書に援用される。

明細書の記載は、理解を容易にする目的で、実施例を用いて詳細に記載しているが、一定の変更および修飾も請求の範囲内であることは理解されよう。

【図1】

FIG.1



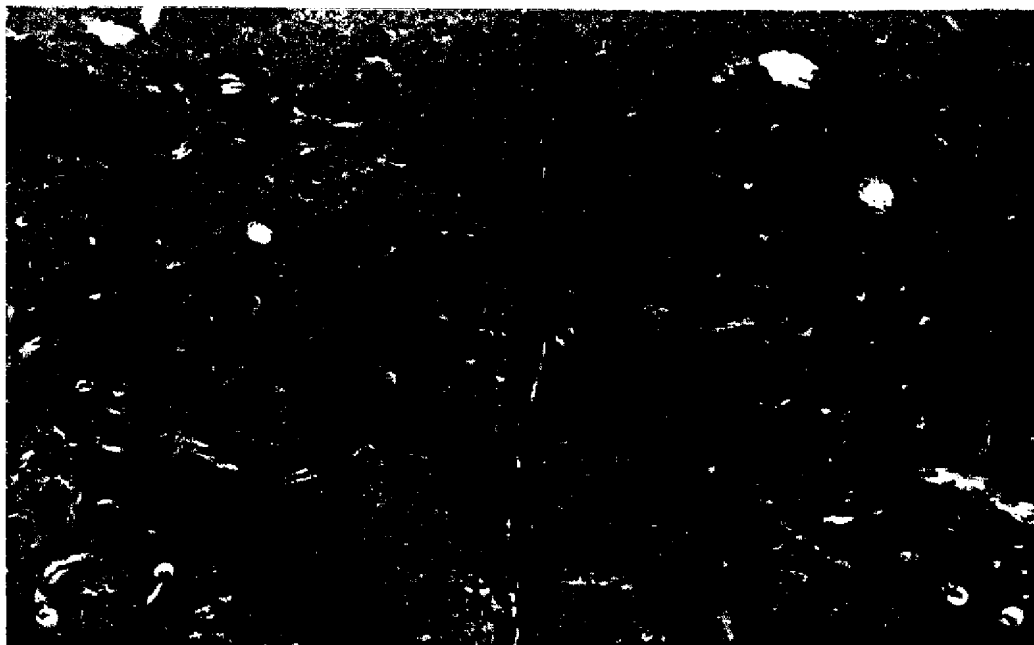
【図2】

FIG.2



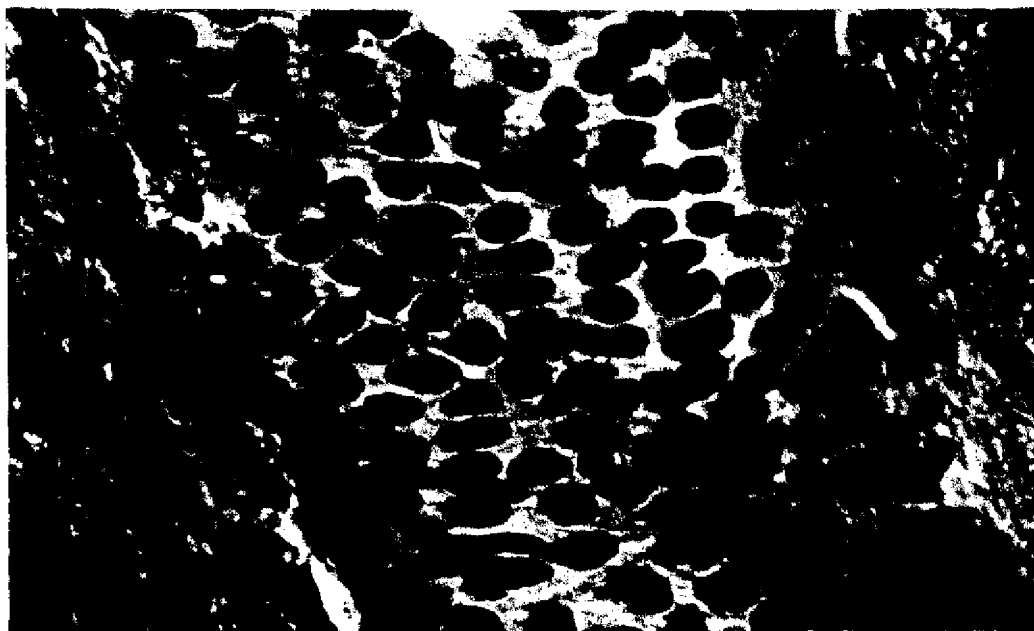
【図3】

FIG.3



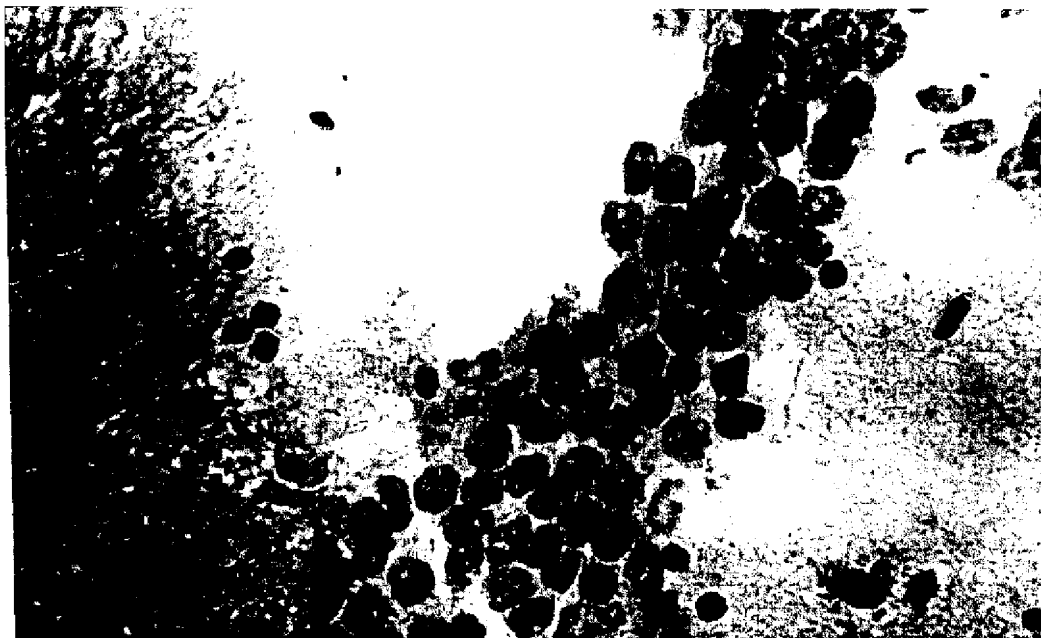
【図4】

FIG.4



【図5】

FIG.5



【図6】

FIG.6



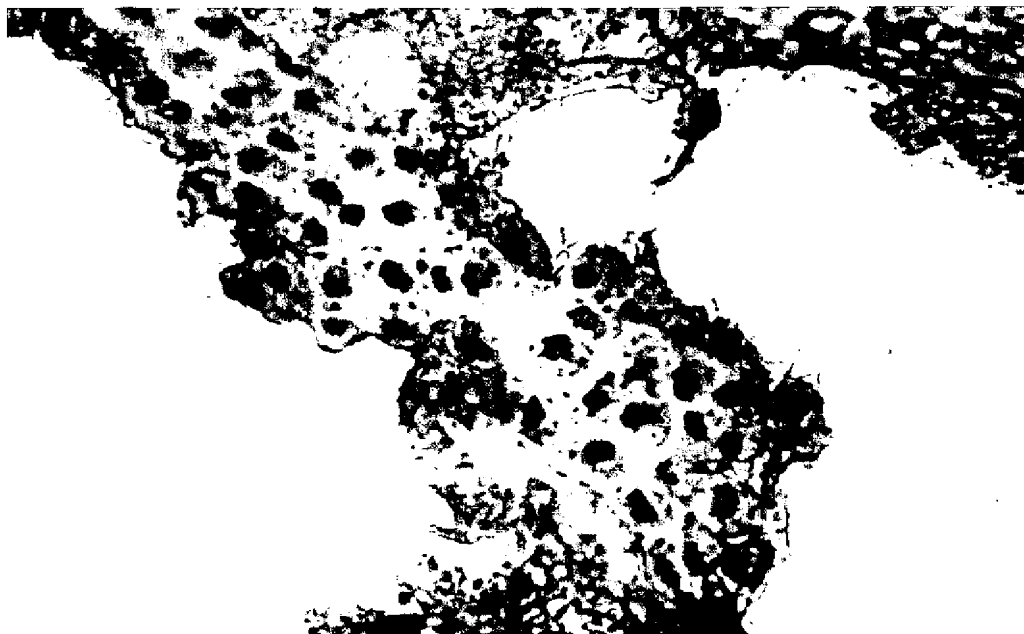
【図7】

FIG.7



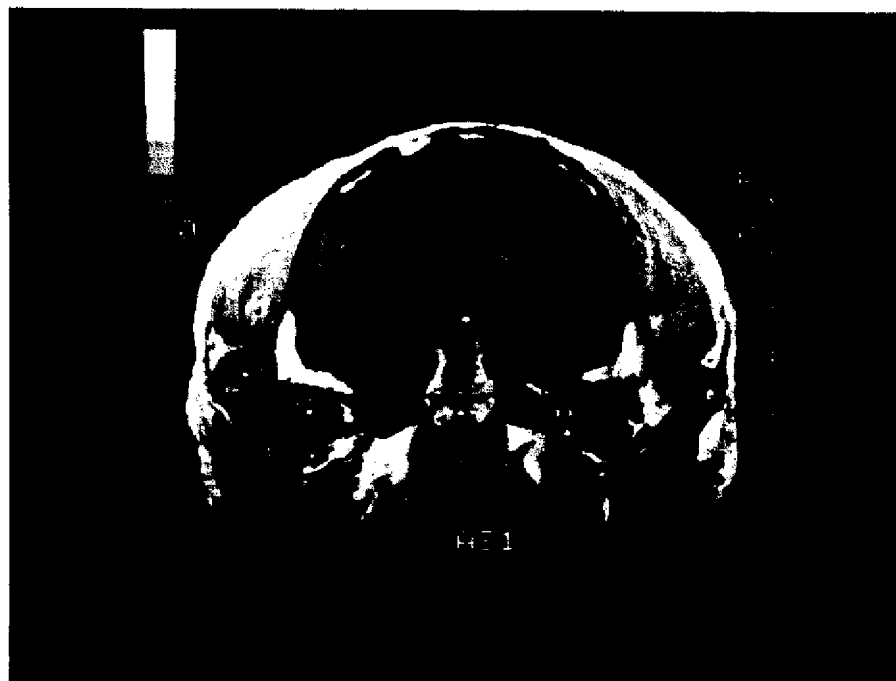
【図8】

FIG.8



【図9】

FIG.9



【図10】

FIG.10

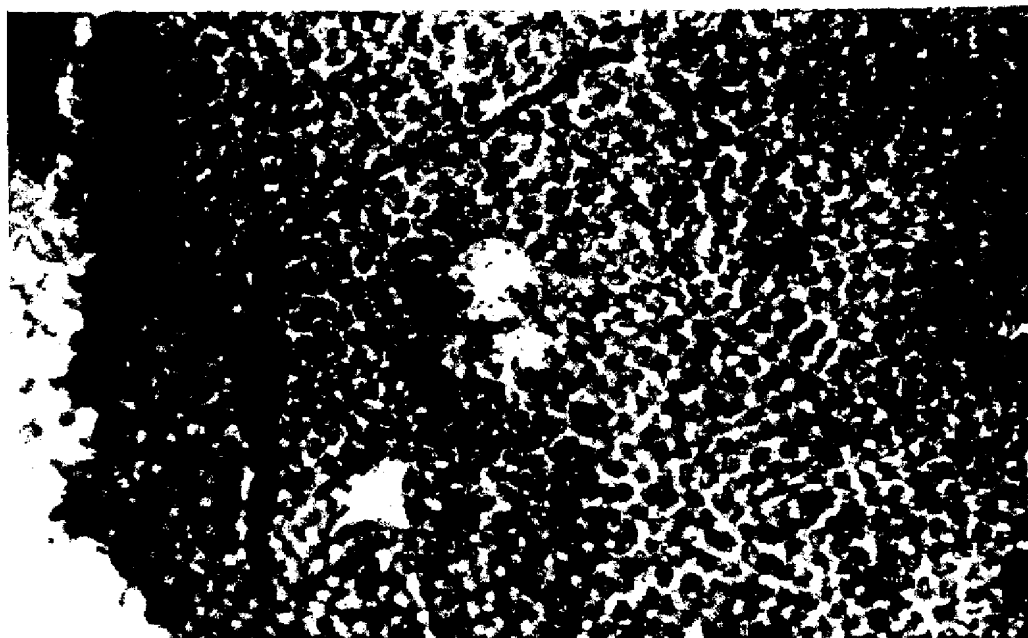
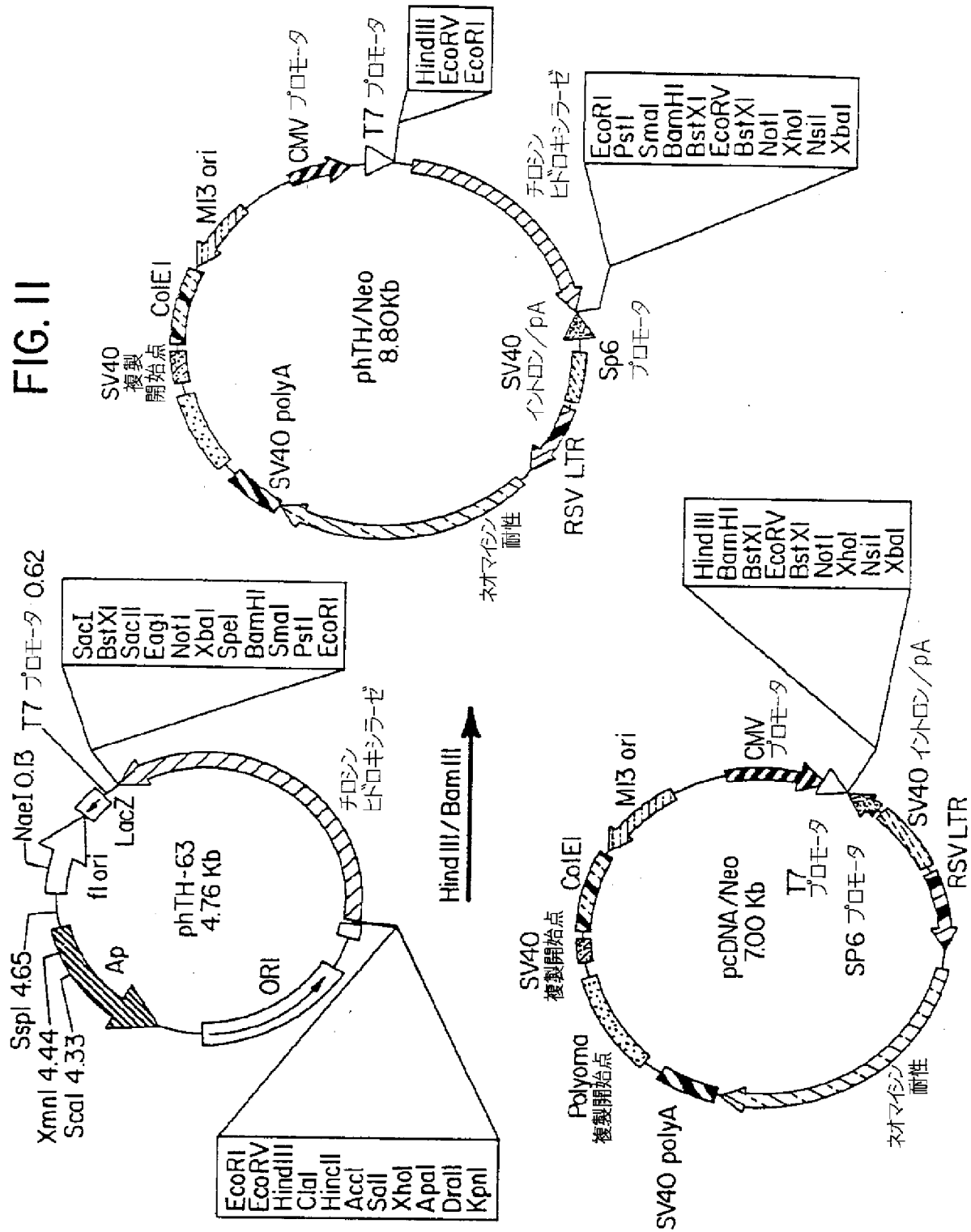
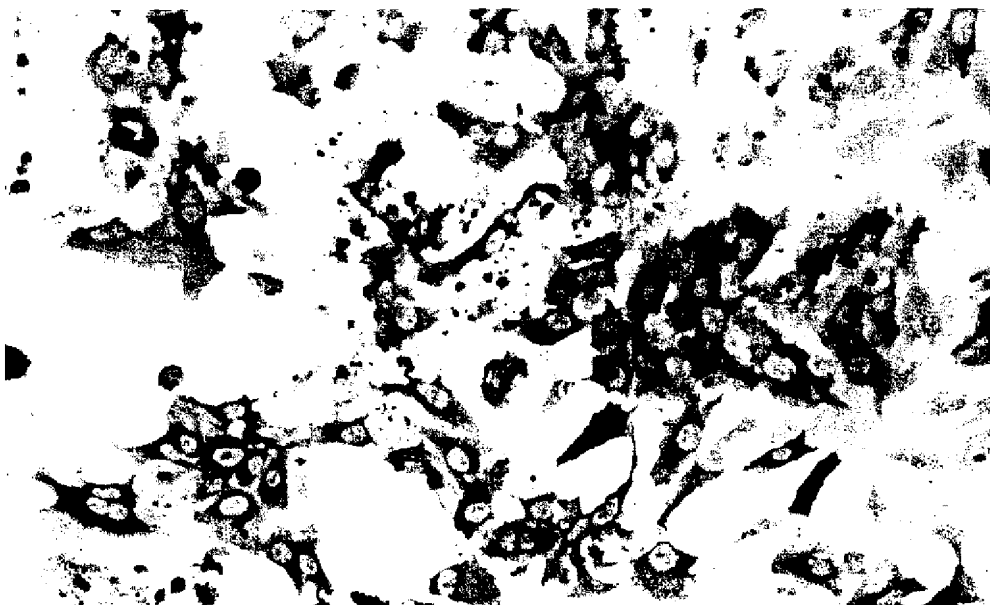


FIG. 11



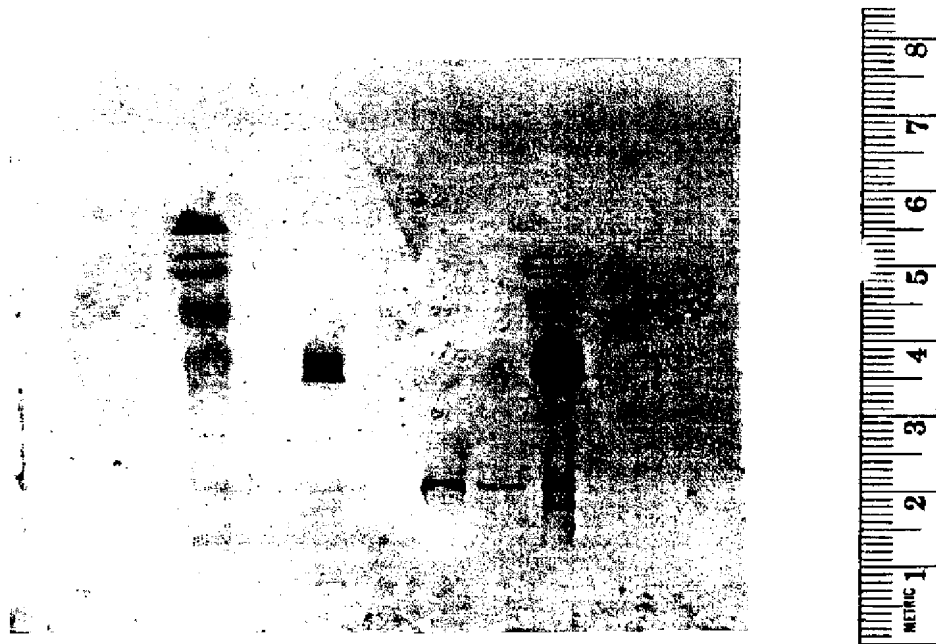
【図12】

FIG.12



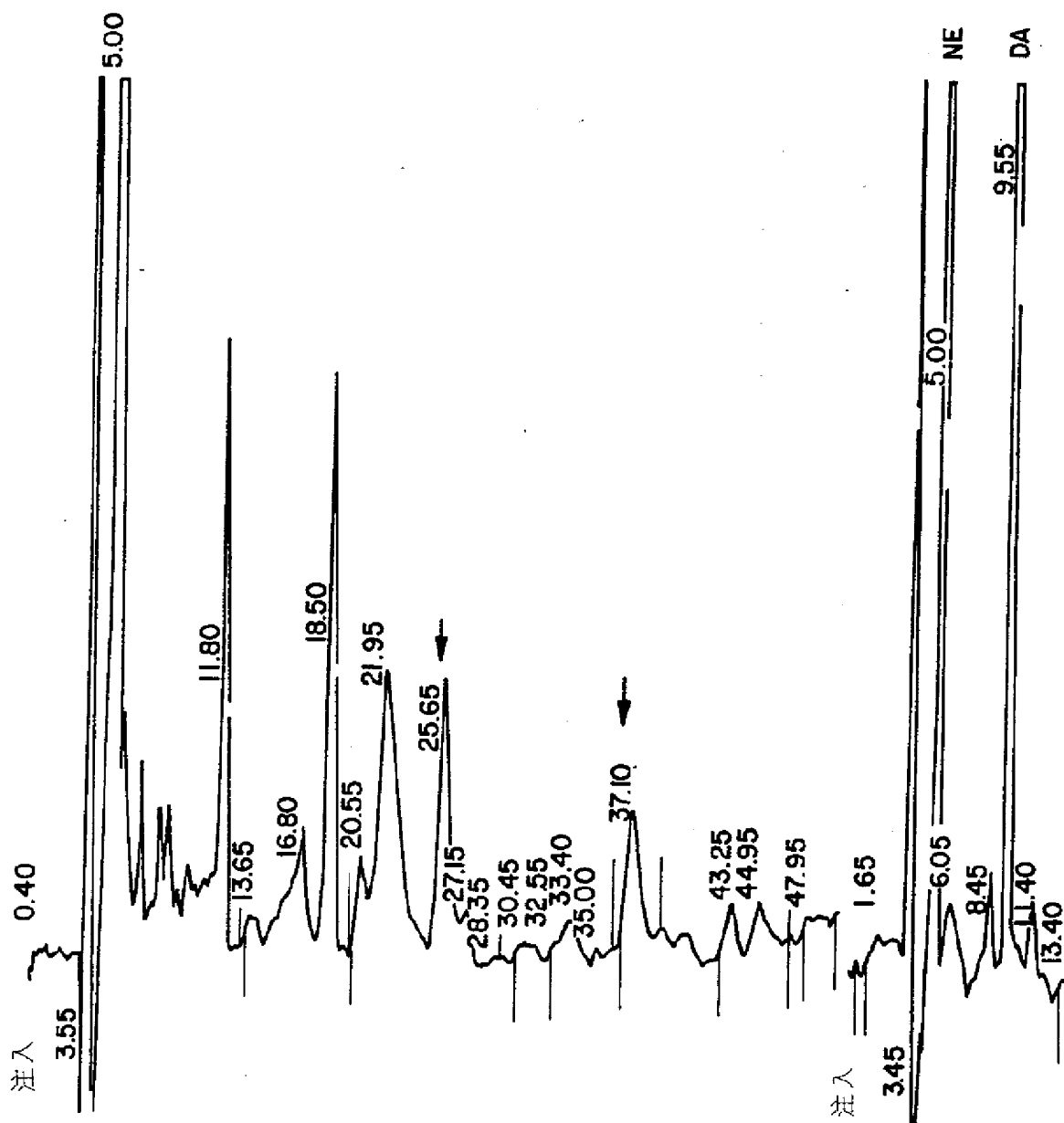
【図13】

FIG.13



【図 14】

FIG. 14



【図15】

FIG.15



【図16】

FIG.16A

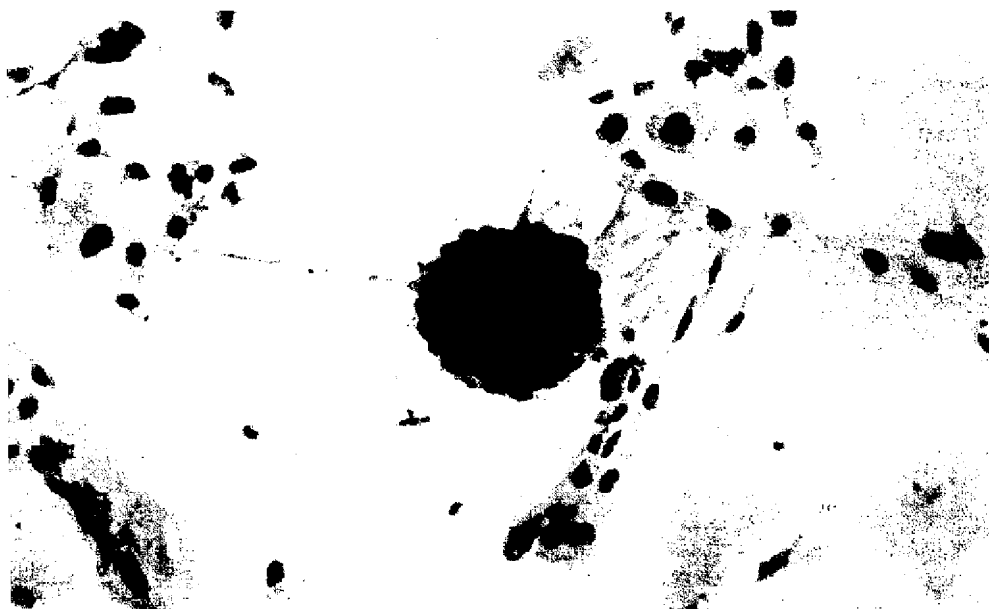
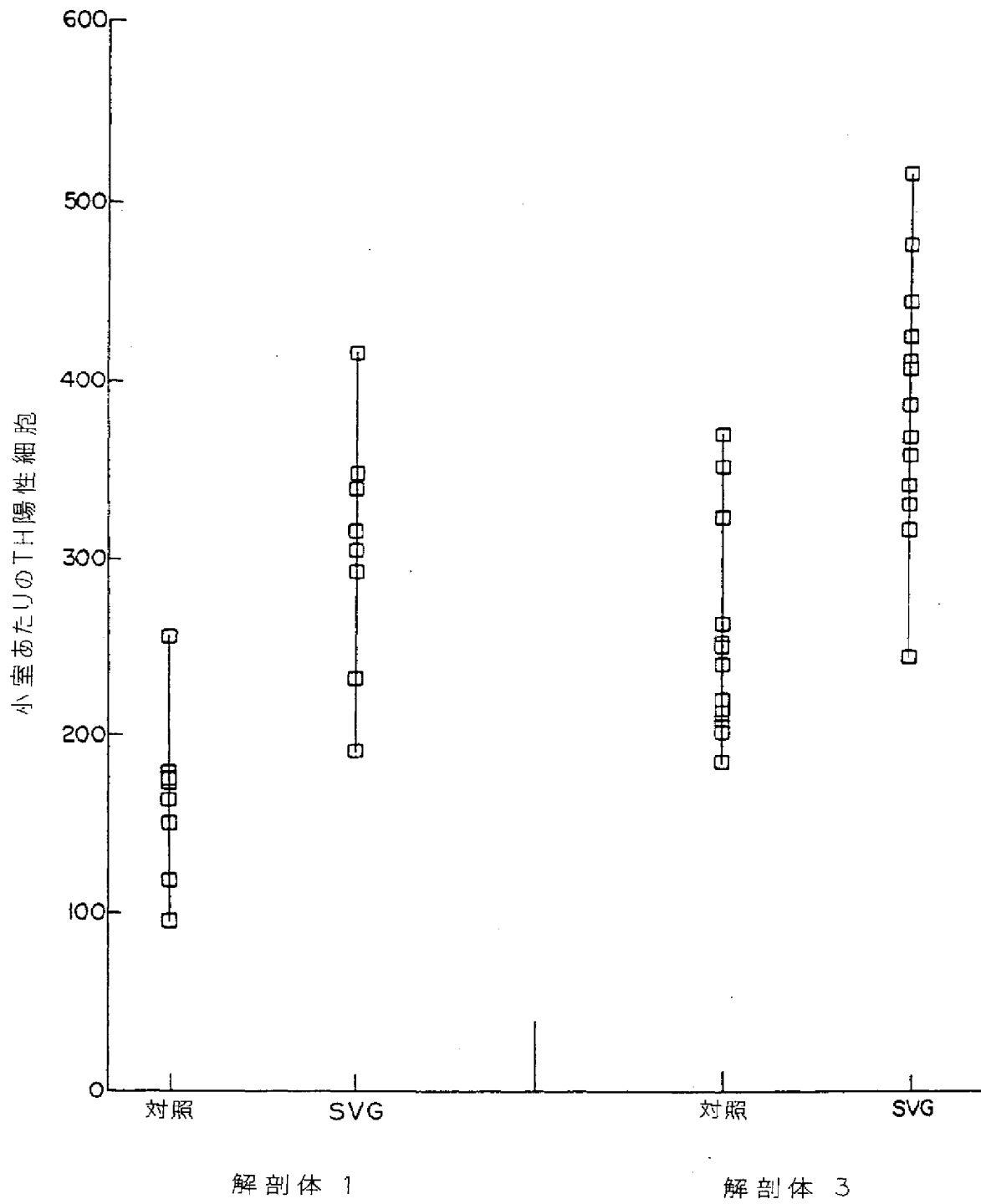


FIG.16B



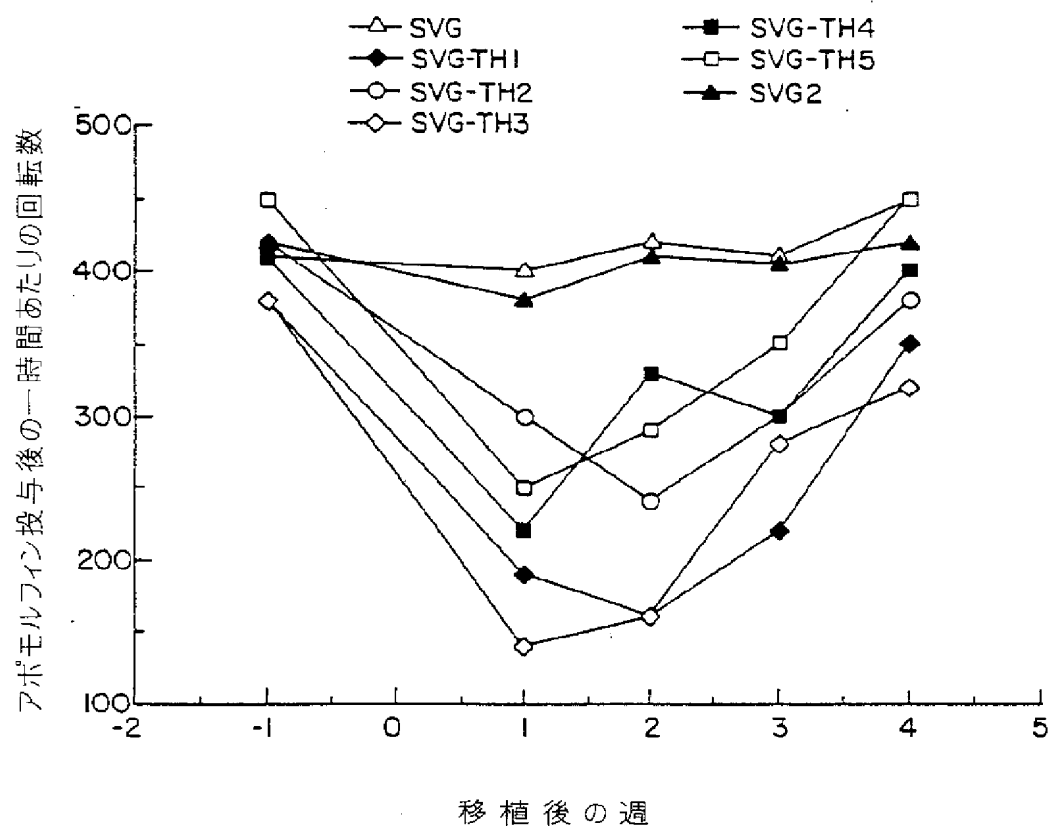
【図17】

FIG. 17



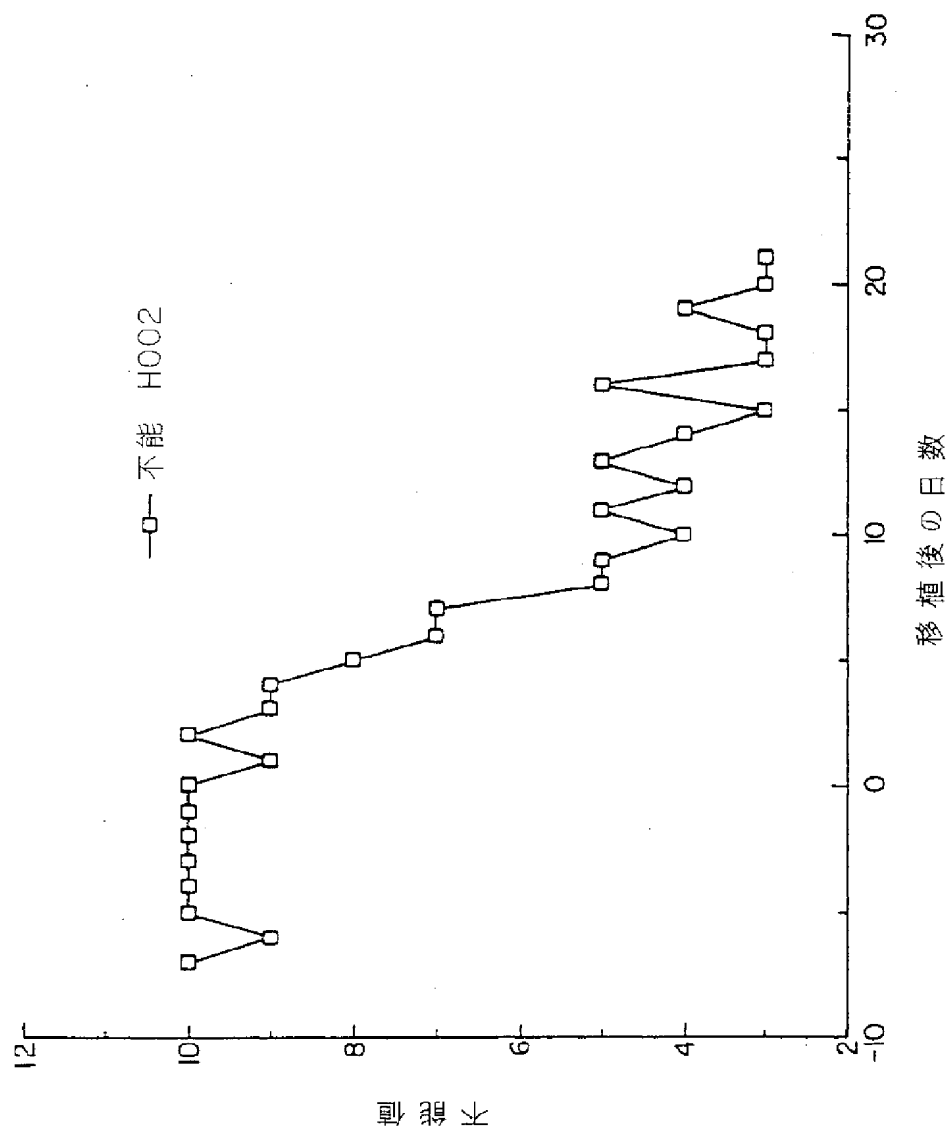
【図18】

FIG. 18

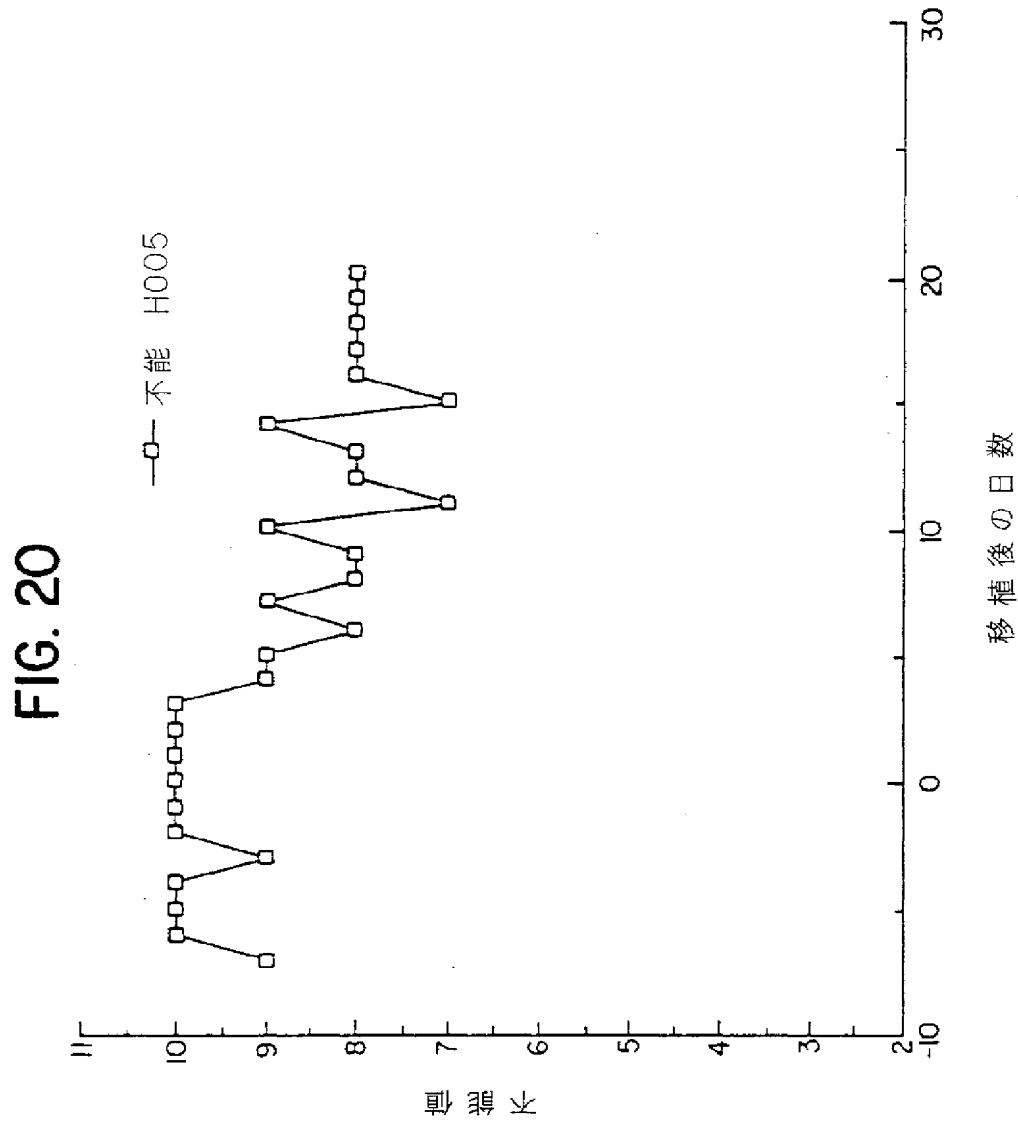


【図19】

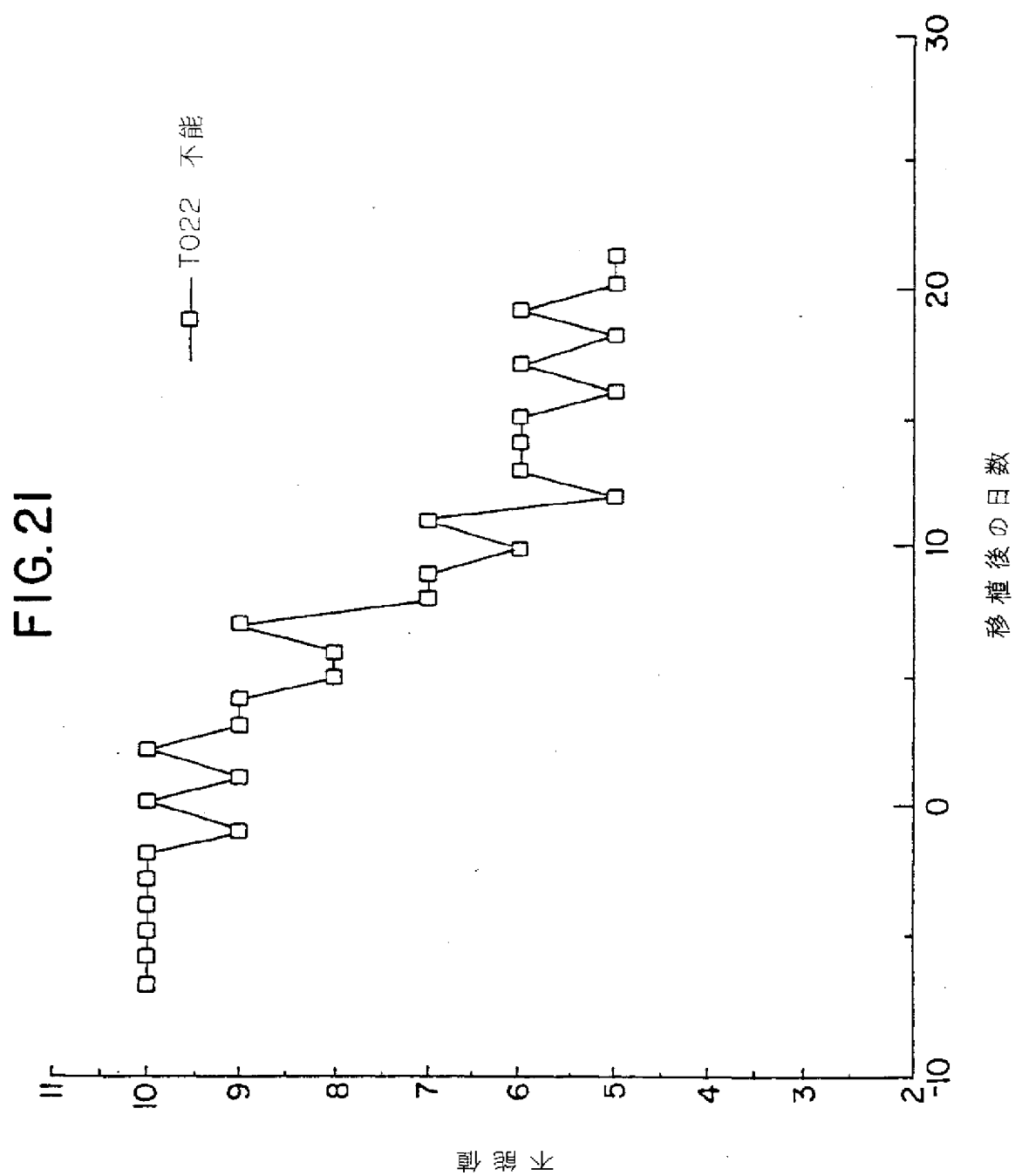
FIG. 19



【図 20】



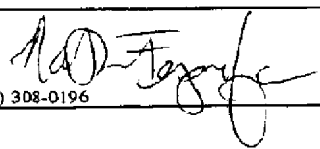
【図 2 1】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/08617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C12N 15/00; A61K 48/00 US CL : 435/172.3, 240.2, 320.1; 514/44; 424/93.21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/172.3, 240.2, 320.1; 514/44; 424/93.21 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) AFS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS, WPIDS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,082,670 A (GAGE ET AL.) 21 January 1992 (21.01.92), see entire document.	1-16
Y	US 4,707,448 A (MAJOR) 17 November 1987 (17.11.87), see entire document.	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 22 JULY 1996		Date of mailing of the international search report 25 JUL 1996
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer ANDREW MILNE  Telephone No. (703) 308-0196

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN

(72)発明者 トーナトーア, カルロ・エス
アメリカ合衆国メリーランド州20782, ユ
ニバーシティ・パーク, クラゲット・ロー
ド 4315

(72)発明者 ヤディド, ガル
イスラエル国クファー・サバ, ハネガフ・
ストリート 2